

Kompensationsvermögen von *Mytilus edulis*
gegenüber mechanischem Stress und erhöhtem $p\text{CO}_2$ -
kombinierte transkriptomische, proteomische und physiologische
Analysen

Responsiveness of *Mytilus edulis*
towards mechanical stress and elevated $p\text{CO}_2$ - combined
transcriptomic, proteomic and physiological analyses

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
- Dr. rer. nat. -

dem Fachbereich 2 Biologie / Chemie
der Universität Bremen
vorgelegt von

Anne Katrin Hüning
Biologin (M.Sc.)

Bremen 2014

GUTACHTER

1. Gutachter

Prof. Dr. H.-O. Pörtner, Universität Bremen
Alfred-Wegener-Institut Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung
Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven

2. Gutachter

Dr. F. Melzner
GEOMAR Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung Kiel
Hohenbergstr. 2, 24105 Kiel

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	iii
Zusammenfassung.....	iv
Summary.....	vii
1 Einleitung.....	1
1.1 Ozeanversauerung	1
1.2 Auswirkungen von Ozeanversauerung auf marine Taxa	4
1.3 Biomineralisierung	7
1.4 Entwicklung, Verbreitung und Relevanz der Miesmuschel <i>Mytilus edulis</i>	11
1.5 Ostsee und Kieler Förde.....	12
1.6 Fragestellungen und experimentelles Vorgehen	14
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Versuchstier.....	16
2.2 Experimenteller Aufbau	16
2.2.1 Freilandinkubation zur Analyse der Schalenregeneration (Inkubation I)	16
2.2.2 Inkubationen unter Laborbedingungen zum Einfluss von Ozeanversauerung (Inkubationen II und III).....	17
2.2.3 Bestimmung der Wasser-Parameter	19
2.2.4 <i>Rhodomonas</i> -Anzucht und Fütterung der Muscheln	19
2.3 Bestimmung von Ganztier-Parametern	19
2.3.1 Sauerstoffverbrauch.....	19
2.3.2 Ammoniumexkretion.....	20
2.3.3 Filtration	20
2.3.4 Wachstumsvermögen (<i>Scope for Growth</i>)	20
2.4 Schalenanalyse	21
2.5 Molekularbiologische Methoden.....	21
2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA	21
2.5.2 Erstellung der cDNA-Bibliothek	22
2.5.3 Quantitative <i>Real-time</i> -PCR	23
2.6 Biochemische Methoden	23
2.6.1 Herstellung von Proteinextrakten	23
2.6.2 Zwei-dimensionale Gel-Elektrophorese	24
2.6.3 Gel-Bild-Analyse.....	25
2.6.4 Massenspektrometrie	25

2.7	Statistische Auswertung	26
3	Publikationen	28
	I: Functional tissue plasticity as a response to initiated shell repair in the blue mussel <i>Mytilus edulis</i>	30
	II: Impacts of seawater acidification on mantle gene expression patterns of the Baltic Sea blue mussel: implications for shell formation and energy metabolism.....	62
	III: Long-term acclimation to elevated P_{CO_2} in the blue mussel <i>Mytilus edulis</i> : energy budgets and tissue-specific proteomics.....	82
4	Diskussion	120
4.1	Charakterisierung des Mantel-Transkriptoms	121
4.2	Transkriptionelle Regulation der Biomineralisierung	124
4.2.1	Induktion von Genen nach Schalenverletzung	124
4.2.2	Einfluss von erhöhtem pCO_2	125
4.2.3	Tyrosinasen	126
4.3	Auswirkungen von erhöhtem pCO_2 auf die Transkription metabolischer und immunaktiver Gene des Mantels.....	129
4.4	Auswirkungen von erhöhtem pCO_2 auf das Proteom von Mantelrand und Kieme	130
4.5	Kohärenz von Genexpression, Proteom und systemischer Kapazität unter erhöhtem pCO_2	131
4.6	Folgen von erhöhtem pCO_2 auf physiologische Mechanismen im Vergleich zu anderen <i>Mytilus</i> -Populationen	138
5	Schlussfolgerung und Ausblick	141
6	Literaturverzeichnis	145
7	Anhang.....	162
8	Danksagung.....	165
9	Erklärung	167

Abkürzungsverzeichnis

ACC	amorphes Calciumkarbonat
ANOSIM	Analysis Of Similarity
ANOVA	Analysis Of Variance
ASB-14	Amidosulfbetain-14
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Ca ²⁺	Calcium-Ion
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
CHS	Chitinsynthase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CO ₃ ²⁻	Karbonat-Ion
CPEROX	Chorion-Peroxidase
dNTPs	Nukleosidtriphosphate
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EPF	Extrapallialflüssigkeit
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GO	Gene Ontology
H ⁺	Proton
HCCA	α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat-Ion
IPG	immobilisierter pH-Gradient
KO	Kontrolle
MOWSE	molecular weight search
mRNA	messenger RNA
MSP	molluscan shell protein
NACR	Nacrein-ähnliches Protein
NH ₄ ⁺	Ammonium
nMDS	non-metric multi-dimensional scaling
NP-40	Nonyl-Phenoxypolyethoxylethanol-40
pCO ₂ (P _{CO2})	CO ₂ -Partialdruck
PCR	Polymerasekettenreaktion
ppm	parts per million
pI	isoelektrischer Punkt
PSU	practical salinity units
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SFDM	shell free dry mass
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TYR	Tyrosinase
vWFA	von Willebrand Faktor Typ A
Ω	Calciumkarbonatsättigung

Zusammenfassung

Seit der industriellen Revolution steigt der CO₂-Gehalt der Atmosphäre stetig an. Da die Weltmeere als CO₂-Senken fungieren, resultiert die Aufnahme von CO₂ schließlich in Reduzierungen des Meerwasser-pH und der Karbonationenkonzentration [CO₃²⁻]. Deshalb wird angenommen, dass kalzifizierende Organismen, die CO₃²⁻ zur Synthese ihrer Skelette benötigen, besonders durch Ozeanversauerung beeinträchtigt sind.

In dieser Arbeit wurden daher zum einen die prinzipiellen molekularen Mechanismen, die der Biomineralisierung der Miesmuschel *Mytilus edulis* zugrunde liegen, untersucht. Zum anderen wurde das Kompensationsvermögen der Muschel gegenüber erhöhtem pCO₂ generell und in Hinblick auf Biomineralisierung analysiert. Für die Studien wurde eine Population der Kieler Bucht ausgewählt, die bereits jahreszeitlich bedingt erhöhten Meerwasser-pCO₂ ausgesetzt ist, welche für die nahe Zukunft prognostiziert werden.

Zunächst wurden Transkriptome aus der zentralen bzw. pallialen/marginalen Region des Mantels, dem für die Biomineralisierung zuständigen Gewebe, von Kontroll- und pCO₂-behandelten Tieren nach einer 8-wöchigen Inkubation (500, 3700 µatm) erstellt. Auf globaler Ebene waren keine starken Änderungen hinsichtlich eines erhöhten pCO₂ nachweisbar. Allerdings zeigten sich gewebespezifische Unterschiede im Expressionsspiegel zahlreicher potentieller Gene (hier: „Contigs“ bestimmt als Ablesungen pro Million), die vermutlich durch die verschiedenen Funktionen der einzelnen Mantelregionen während Biomineralisierung bedingt sein könnten. Zur weiteren Aufdeckung von Mantel-spezifischen Transkripten wurde das Expressionsniveau einzelner Gensequenzen des pallialen/marginalen Mantels mit denen aus anderen Geweben verglichen. Dabei konnten 327 Sequenzen identifiziert werden, die vermehrt im pallialen/marginalen Mantel exprimiert wurden, und somit eine Rolle bei der Biomineralisierung spielen könnten. 155 dieser Sequenzen weisen Signalpeptide auf, die eine extrazelluläre Lokalisation der abgeleiteten Proteine vorhersagen. Um den Prozess der Biomineralisierung näher zu beleuchten, wurden Rekalzifizierungsexperimente durchgeführt. Hierbei wurde je eine Schalenseite pro Muschel über der zentralen Mantelregion der Tiere verletzt. Nach jeweils 20, 29 und 36 Tagen wurden die neu synthetisierten Schalenkomponenten mittels Stereomikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie und Raman-Spektroskopie dokumentiert. Während der Regeneration deckte zunächst organisches Material die verletzten Schalenbereiche ab. Nachfolgend wurden Kalzitkristalle und Aragonitplättchen abgelagert. Mittels quantitativer *Real-time*-PCR wurden Genexpressionsmuster ausgewählter Biomineralisierungs-Transkripte aus dem zentralen und pallialen/marginalen Mantel beider Seiten analysiert. Diverse Transkripte des Mantelrands wurden Regenerationszeit-abhängig im zentralen Mantel der verletzten Seite induziert: an Tag 20 war die Expression von zwei Tyrosinasen am höchsten, ab Tag 29 wurde die Expression eines Nacrein-ähnlichen Transkripts induziert. Die Expression von p4338, einem nicht näher charakterisierten, aber im Mantelrand

hoch exprimierten Transkript, war während der gesamten Regenerationszeit erhöht. Diese Befunde verdeutlichen zum einen die Funktion der potentiellen Kandidatengene für die Biomineralisierung und bekräftigen zum anderen die funktionale Plastizität des Mantels in Bezug auf Kalzifizierung.

Im Anschluss an eine 8-wöchige Inkubation der Muscheln wurde der Einfluss von erhöhtem $p\text{CO}_2$ (500, 900, 2000, 3700 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$) auf die Genexpression des Mantelgewebes (zentral, pallial/marginal) untersucht. Hierfür wurden Transkripte ausgewählt, deren Proteine funktional an der Kalzifizierung, dem Metabolismus oder der Stressantwort beteiligt sind. Es konnte dargelegt werden, dass die Mehrheit der für diese Studie ausgesuchten Biomineralisierungs-Transkripte nicht durch erhöhten $p\text{CO}_2$ beeinflusst wurde. Hingegen sank die Expression einer Chitinase, die vermutlich am Kalzifizierungsprozess beteiligt ist, mit steigendem $p\text{CO}_2$. Dieses Expressionsmuster korreliert mit einer linearen Abnahme der Kalzifizierung von Muscheln derselben Inkubation (Thomsen und Melzner 2010). Der $p\text{CO}_2$ - Dosis-abhängige Anstieg der Expression einer Tyrosinase gibt Hinweise auf einen erhöhten Schutzmechanismus der Schale, da Tyrosinasen eine Rolle bei der Synthese des Periostracums spielen. Zusätzlich war die Expression von Genen, die am Energie- und Proteinmetabolismus beteiligt sind (ATP-Synthase, Hexokinase und Elongationsfaktor alpha), durch moderaten $p\text{CO}_2$ beeinflusst. Erhöhte $p\text{CO}_2$ hatten jedoch keinen Einfluss auf Transkripte der Stressantwort. Korrelationsnetzwerke aller analysierten Gene dienten der Offendeckung von möglichen regulatorischen Netzwerken und der Verbindung unterschiedlicher Prozesse. Diese Studie ermöglichte somit Einblicke in molekulare Mechanismen, die die Befunde an physiologischen Anpassungen der Parallelstudie -Anstieg des Sauerstoffverbrauchs bei moderatem $p\text{CO}_2$, Anstieg der Ammoniumexkretion mit steigendem $p\text{CO}_2$, Abnahme der Kalzifizierung mit steigendem $p\text{CO}_2$ (Thomsen und Melzner 2010) - mechanistisch untermauern.

Der Einfluss eines dauerhaft erhöhten $p\text{CO}_2$ auf die Physiologie und das Proteom der Miesmuschel wurde im Anschluss einer 1-jährigen Inkubation (600, 1300, 2400, 4200 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$) bestimmt. Die Klärungsrate der Tiere nahm Dosis-abhängig ab, eine reduzierte Kalzifizierung wurde lediglich bei 4200 μatm sichtbar und mag auf eine unzureichende Energiezufuhr für das Wachstum hindeuten. Sauerstoffverbrauch und Ammoniumexkretion waren im Gegensatz zur vorherigen Studie (8-wöchige Inkubation, Thomsen und Melzner 2010) nicht beeinflusst. Proteomische Analysen des Mantels (pallial/marginal) verdeutlichten vorrangig Modifikationen von Proteinen des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix. Im Kiemengewebe waren Proteine verschiedenartiger funktionaler Gruppen, wie beispielsweise oxidativer Stress, Proteinabbau, Energiemetabolismus, Proteinmodifikation, Zellzyklus, neben Zytoskelett und extrazellulärer Matrix beeinträchtigt.

Durch die kombinierten transkriptomischen und proteomischen Analysen kann postuliert werden, dass kompensatorische Anpassungen bevorzugt bei moderatem $p\text{CO}_2$ -Anstieg erfolgten. Dieses Vermögen war jedoch unter stark erhöhtem $p\text{CO}_2$ (3700, 4200 μatm) weniger ausgeprägt. Obwohl die Miesmuschel der Kieler Bucht relativ robust gegenüber moderatem $p\text{CO}_2$ -Anstieg reagiert, bleibt zu untersuchen, welchen Einfluss eine chronische Aussetzung unter erhöhtem $p\text{CO}_2$, vor allem auch unter Berücksichtigung der zu erwartenden Temperaturerhöhung und der Zunahme von Extremereignissen, auf diese Population haben wird.

Summary

The CO₂ content of the atmosphere is increasing since the onset of the industrial revolution. As a result, CO₂ is taken up by the oceans, which leads to decreases in seawater pH and carbonate ion concentration [CO₃²⁻]. As calcifying organisms use CO₃²⁻ to construct their skeletons, they are suggested to be particularly impaired by ocean acidification.

In this study, the basic molecular mechanisms underlying biomineralization of the blue mussel *Mytilus edulis*, and its acclimation potential towards elevated *p*CO₂ in general and regarding biomineralization in particular were determined. For these experiments, a population from Kiel Fjord was used, which is already seasonally exposed to elevated *p*CO₂ values that are predicted for the near future.

First, separate transcriptomes were generated from the central and pallial/marginal mantle, the tissues responsible for biomineralization. For this purpose, animals that have been incubated for eight weeks at 500 µatm (control) and 3700 µatm *p*CO₂ were used. Analyses revealed only minor global changes as a result of elevated *p*CO₂. However, differences in the expression of genes (estimated here as read numbers per million per contig) were notable between the two tissues, putatively corresponding to the functional differences of the mantle zones with respect to biomineralization. To identify mantle-specific transcripts, reads per million per contig from pallial/marginal mantle were compared with those from other tissues. 327 sequences were expressed higher in pallial/marginal mantle compared to other tissues and are thus suggested to function in biomineralization. 155 of these sequences were characterized by signal peptides, which indicate an extracellular localization of the deduced proteins. To elucidate the process of biomineralization, experiments on shell regeneration were performed. Therefore, one valve per mussel was damaged above the central mantle region. After 20, 29 and 36 days, the newly synthesized shell constituents were analyzed with stereo microscopy, scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. Initially, organic material covered the damaged area. Subsequently, calcitic crystals were formed, followed by aragonitic tablets. Using quantitative *Real-time* PCR, gene expression profiles of selected biomineralizing transcripts were determined from central and pallial/marginal mantle regions underlying both valves. Several genes were induced dependent on the repair stages in the central mantle of the damaged site: at day 20, the expression of two tyrosinases was highest, from day 29 on, the expression of a transcript coding for a nacrein-like protein was induced. The expression of p4338, an uncharacterized but highly expressed transcript from pallial/marginal mantle, was elevated during the entire experimental period. These results illustrate firstly the function of those potential candidate genes for biomineralization and secondly the functional plasticity of mantle tissue regarding calcification.

SUMMARY

The impact of elevated $p\text{CO}_2$ on the gene expression of mantle tissue (central, pallial/marginal) from *M. edulis* was determined following an incubation for 8 weeks (500, 900, 2000, 3700 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$). Therefore, transcripts involved in biomineralization, metabolism and stress response were chosen. Most of the selected biomineralizing transcripts were not influenced by elevated $p\text{CO}_2$. However, the expression of a chitinase, putatively involved in calcification, declined with increasing $p\text{CO}_2$. This expression pattern correlated well with a linear reduction in calcification of mussels from the same incubation (Thomsen and Melzner 2010). The expression of a tyrosinase increased dose-dependently with increasing $p\text{CO}_2$. This implies an enhanced shell protection in response to ocean acidification, as tyrosinases are involved in periostracum formation. Additionally, the expression of genes responsible for energy and protein metabolism (ATP synthase, hexokinase, elongation factor alpha) was affected by moderately elevated $p\text{CO}_2$. However, elevated $p\text{CO}_2$ had no influence on transcripts involved in stress response. Correlation networks combining the expression levels of all analyzed genes could establish regulatory networks and the connection of different pathways. In summary, this study could provide insights into the molecular mechanisms, which mechanistically substantiates the physiological adjustments towards elevated $p\text{CO}_2$ demonstrated in the companion study (Thomsen and Melzner 2010) - increase in oxygen consumption at moderate $p\text{CO}_2$, up-regulation of ammonium excretion with increasing $p\text{CO}_2$ and decrease in calcification with increasing $p\text{CO}_2$.

The impacts of chronic exposure (600, 1300, 2400, 4200 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$) on the physiology and the proteome of the blue mussel were determined following an incubation for one year. Clearance rates decreased dose-dependently with increasing $p\text{CO}_2$. Additionally, calcification was negatively affected by highest $p\text{CO}_2$, which might be due to an insufficient uptake of energy equivalents. However, oxygen consumption and ammonium excretion were not influenced, contrasting the previous results following a shorter acclimation period (8 weeks: Thomsen and Melzner 2010). The analyses of mantle (pallial/marginal) and gill proteomes revealed modifications in proteins of diverse groups. In mantle tissue, abundances of proteins belonging to cytoskeleton and extracellular matrix changed, whereas in gill tissue proteins of a broader range of groups (cytoskeleton, extracellular matrix, oxidative stress, protein degradation, energy metabolism, protein modification, cell cycle) were affected.

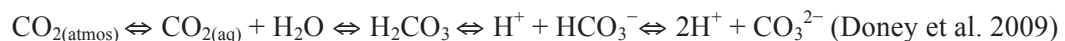
The combined transcriptomic and proteomic analyses revealed, that *M. edulis* from Kiel Fjord is capable to compensate for CO_2 -stress at moderate $p\text{CO}_2$ increase. However, this ability was reduced at high $p\text{CO}_2$ (3700, 4200 μatm). Although the blue mussel from Kiel Fjord seems to withstand medium elevated $p\text{CO}_2$, it remains to be established, how this population will be impaired by chronic exposure to high $p\text{CO}_2$ especially when considering the prospected warming and more frequent extreme events in the near future.

1 Einleitung

Seit der industriellen Revolution steigt der Ausstoß von CO₂ in die Atmosphäre stetig an. Betragen bis zum Jahr 1800 vor-industrielle atmosphärische CO₂-Werte ca. 280 ppm (Friedli et al. 1986), liegt der derzeitige atmosphärische CO₂-Gehalt (Oktober 2013) bei durchschnittlich 394 ppm (Mauna Loa Observatory). Eine solche drastische Zunahme von über 110 ppm über einen Zeitraum von nur ca. 200 Jahren wurde nie zuvor für die letzten 420.000 Jahren bestimmt (Petit et al. 1999). Als führendes Treibhausgas trägt CO₂ hauptverantwortlich zur globalen Klimaveränderung und Erderwärmung bei (Rodhe 1990) und kann durch vermehrte Freisetzung ungeahnte Folgen für die Umwelt haben. Durch die Aktualität dieser Veränderung sind diverse nationale und internationale Projekte entstanden, die gezielt die biologischen Effekte von Ozeanversauerung als Folge eines ansteigenden CO₂-Ausstoßes untersuchen.

1.1 Ozeanversauerung

Eine Erhöhung des atmosphärischen CO₂-Gehalts kann neben der Klimaerwärmung zu einer Versauerung der Ozeane führen. Ozeane gelten als CO₂-Senken und haben bislang ca. 50% des anthropogen erzeugten CO₂ aufgenommen (Sabine et al. 2004). Bei diesem Prozess reagiert in Wasser gelöstes CO₂ mit H₂O und bildet Kohlensäure (H₂CO₃). Da Kohlensäure äußerst instabil ist, dissoziiert diese in ein Bikarbonat (HCO₃⁻) und ein Proton (H⁺) oder in ein Karbonation (CO₃²⁻) und 2 Protonen:



Der derzeitige globale pH beträgt 8,1 und ist damit um 0,1 Einheiten gegenüber dem vor-industriellem Wert gesunken (Caldeira und Wickett 2005). Bei einem pH von 8,1, einer Salinität von 35 und einer Temperatur von 25°C liegen die gelösten inorganischen Karbonate (DIC: dissolved inorganic carbonates) zu 86,5% als HCO₃⁻, 13% als CO₃²⁻ und 0,5% als CO₂ vor (Zeebe und Gladrow 2001). Als Folge der Aufnahme von CO₂ durch die Ozeane verschieben sich die Anteile des Karbonatsystems, sodass sich die Konzentration von HCO₃⁻ erhöht, während gleichzeitig die Karbonationen-Konzentration und der pH erniedrigt werden (Abb. 1.1).

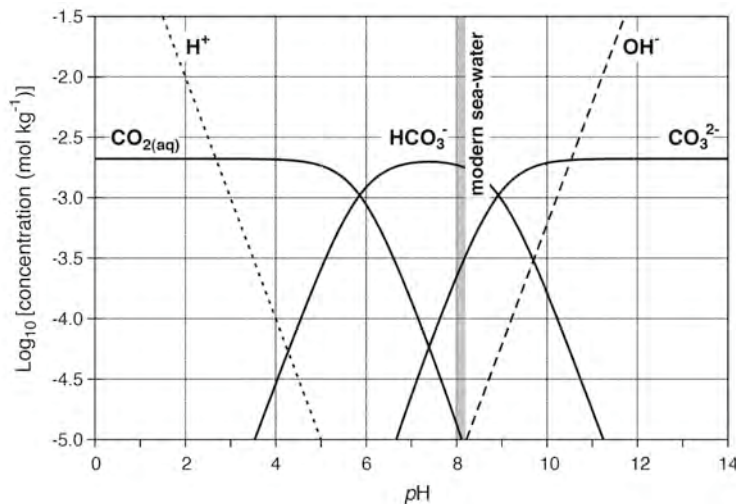


Abb. 1.1: Bjerrum-Plot (aus: Ridgwell und Zeebe, 2005). Eine Verschiebung des pH beruht auf den Änderungen der relativen Anteile von CO_2 , HCO_3^- und CO_3^{2-} im Meerwasser.

Einhergehend mit einer Reduzierung von gelöstem CO_3^{2-} sinken die Calciumkarbonatsättigungen (Ω_{arg} , Ω_{kal}) von Aragonit und Kalzit, den vorherrschenden Polymorphen bei Biomineralisierungsprozessen, wie z.B. der Schalenbildung von Mollusken. Die Calciumkarbonatsättigungen berechnen sich aus dem Ionenprodukt der Calciumionenkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]$) und der Karbonationenkonzentration ($[\text{CO}_3^{2-}]$), dividiert durch das stöchiometrische Löslichkeitsprodukt (K_{sp}^*) (Feely et al. 2004):

$$\Omega_{\text{arg/kal}} = [\text{Ca}^{2+}][\text{CO}_3^{2-}]/K_{\text{sparg/spkal}}^*$$

Da die Calciumkonzentration des Meerwassers nicht stark variiert, wird eine Verschiebung von Ω hauptsächlich durch Änderungen in $[\text{CO}_3^{2-}]$ hervorgerufen (Feely et al. 2004). Bei $\Omega > 1$ sind die Ozeane mit CO_3^{2-} gesättigt, und die Bildung von Calciumkarbonat (CaCO_3) wird gefördert. Sinkt hingegen $\Omega < 1$, wird eine Dissoziation von CaCO_3 begünstigt. Aragonit ist bedingt durch sein höheres Löslichkeitsprodukt ($7,1 \times 10^{-9}$ bei 25°C und 1 atm Gesamtdruck) mehr löslich als Kalzit ($4,5 \times 10^{-9}$ bei 25°C und 1 atm Gesamtdruck) (Degens 1976, Berner 1965). In zunehmenden Wassertiefen steigt der Druck bei gleichzeitigem Absinken der Temperatur, was eine Zunahme der Löslichkeitsprodukte für Kalzit und Aragonit zur Folge hat (Berner 1965). Die höhere Löslichkeit von Aragonit impliziert, dass Meere an Aragonit verglichen zu Kalzit in geringeren Wassertiefen untersättigt sind, hingegen sich Kalzit auch in vergleichbar tieferen Wasserschichten im thermodynamischen Gleichgewicht befindet (Hudson 1967, Feely et al. 2004). Als Folge von erhöhtem und stetig ansteigendem atmosphärischen CO_2 werden Ozeane zunächst an Aragonit untersättigt werden (Cao und Caldeira 2008, Abb. 1.2).

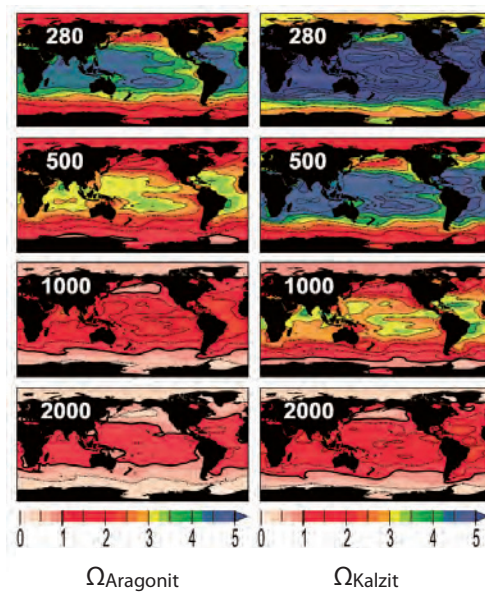


Abb. 1.2: Prognostizierter Sättigungszustand von Aragonit und Kalzit unter verschiedenen atmosphärischen $p\text{CO}_2$ -Werten. Bereits ab 500 ppm ist der südliche Ozean an Aragonit untersättigt (modifiziert aus: Cao und Caldeira, 2008).

Das Ausmaß von Ozeanversauerung ist stark vom zukünftigen anthropogenen CO_2 -Ausstoß abhängig. Daher wurden mit verschiedenen Modellen entsprechende CO_2 -Werte prognostiziert (Wigley et al. 1996, Nakicenovic et al. 2000, Caldeira und Wickett 2005). Szenarien mit fortschreitendem Anstieg von CO_2 -Emissionen in die Atmosphäre (SRES-Szenarien) werden von Projektionen unterschieden, die eine Stabilisierung des CO_2 -Ausstoßes ab dem Jahr 2300 vorhersagen (WRE-Szenarien) (Abb. 1.3). Unter Zuhilfenahme der SRES-Szenarien wurden maximale (A2, 970 ppm) und minimale (B1, 650 ppm) CO_2 -Konzentrationen der Atmosphäre für das Jahr 2100 kalkuliert (Caldeira und Wickett 2005). Die Unterschiede zwischen den Szenarien ergeben sich aus verschiedenen Storylines: das Szenario A2 ist durch eine heterogene Welt mit fortlaufendem Anstieg der Weltbevölkerung und regional orientiertem ökonomischen Wachstum charakterisiert; B1 stellt eine konvergente Welt mit einer zunächst wachsenden, dann sinkenden Weltbevölkerung dar, ist jedoch durch Änderungen von Strukturen hin zu Dienstleistungs- und Informationstechnologien und Einführung von Ressourcen-effizienten Technologien gekennzeichnet (Nakicenovic et al. 2000). Angeknüpft an die unterschiedlichen SRES-Szenarien kann der Oberflächen-pH der Meere zum Ende des Jahrhunderts um 0,3-0,5 pH-Einheiten sinken (Caldeira und Wickett 2005).

Auch in heutigen Zeiten finden sich lokal bereits Reduktionen des Meerwasser-pH, die durch natürliche Vorkommnisse bedingt sind. Zu diesen gehören beispielsweise Auftriebe von CO_2 -reichen Tiefenwassern (Feely et al. 2008, Thomsen et al. 2010), jahreszeitlich hervorgerufene Entstehung von hypoxischen und anoxischen Wasserschichten (Melnzer et al. 2013) und CO_2 -Einträge durch submarine Vulkane (Hall-Spencer et al. 2008, Tunncliffe et al.

2009, Kroeker et al. 2011). Auch in Flussmündungen können Variabilitäten im pH auftreten (Waldbusser et al. 2011). Diese natürlichen Schwankungen im Meerwasser- $p\text{CO}_2$ werden durch eine fortschreitende Ozeanversauerung verstärkt.

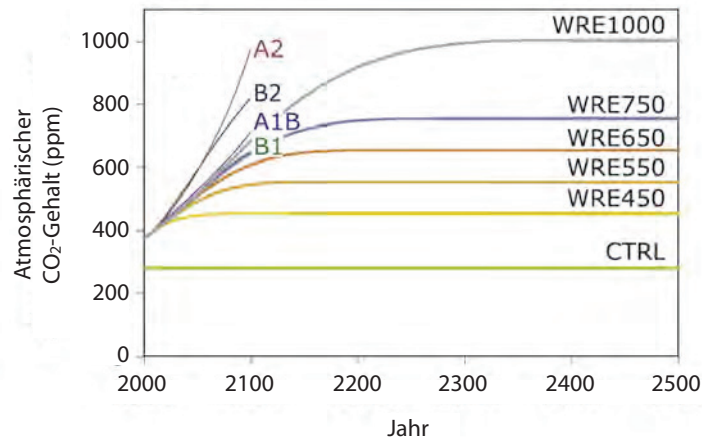


Abb. 1.3: Prognostizierte atmosphärische CO_2 -Konzentrationen für die SRES-Szenarien und die WRE-Stabilisierungs-Szenarien (modifiziert aus: Caldeira und Wickett, 2005). Maximale (Szenario A2) und minimale (Szenario B1) CO_2 -Konzentrationen von 970 und 650 ppm werden für das Jahr 2100 vorhergesagt.

1.2 Auswirkungen von Ozeanversauerung auf marine Taxa

Ein Anstieg von gelöstem CO_2 in den oberflächennahen Wasserschichten führt letztendlich zu einer erhöhten Diffusion und Äquilibration von CO_2 in extra- und intrazellulären Flüssigkeiten von marinen Organismen. Wie im Meerwasser reagiert CO_2 dort mit H_2O zu HCO_3^- und H^+ und resultiert somit in einer Reduktion des pH von Körperflüssigkeiten (Fabry et al. 2008).

Eine Strategie, dem Ausmaß einer solchen Azidose entgegenzuwirken, ist die kompensatorische Akkumulation von HCO_3^- in extrazellulären Flüssigkeiten durch transepitheliale Ionentransportprozesse und die Bindung von Protonen mittels Nicht-Bikarbonat-Puffern wie Aminosäure-Seitenketten und Phosphatgruppen (Fabry et al. 2008, Melzner et al. 2009). Diese Mechanismen sind bevorzugt in metabolisch aktiven Organismen mit hohen ionenregulierenden Kapazitäten, wie beispielsweise Cephalopoda (Gutowska et al. 2010), Teleostei (Larsen et al. 1997, Michaelidis et al. 2007, Baker et al. 2009) und dekapoden Crustacea (Pane und Barry 2007) vorhanden. Ionentransport resultiert im optimalen Falle in einer vollständigen Kompensation. Eine aktive Kompensation eines reduzierten pH in extrazellulären Flüssigkeiten findet hingegen in Organismen, wie beispielsweise Echinodermata und Bivalvia, die durch geringes ionen-regulierendes Potential gekennzeichnet sind, nicht, langsam oder nur unvollständig statt (Miles et al. 2007, Spicer et al. 2011, Stumpp et al. 2012, Lindinger et al. 1984, Michaelidis et al. 2005, Thomsen et al. 2010). Obwohl für hypometabolische *Mytilus galloprovincialis* und *M. edulis* eine Anreicherung von HCO_3^- in der

Hämolymphe unter stark hyperkapnischen Bedingungen (5000 ppm und 34000 ppm) nachgewiesen wurde, war dieser Anstieg an HCO_3^- jedoch nicht mit ionenregulatorischen Kapazitäten, sondern mit einer Auflösung der Schale diskutiert worden (Michaelidis et al. 2005, Lindinger et al. 1984).

Eine unkompensierte oder nur teilweise kompensierte Azidose der Extrazellulärflüssigkeiten kann zur Herabsetzung des Metabolismus (metabolische Depression) in sensitiven marinen Invertebraten führen (Reipschläger und Pörtner 1996, Pörtner et al. 1998). Anzeichen einer metabolischen Depression, die eine Anpassungsstrategie zum Überleben unter suboptimalen Bedingungen darstellt (Hand und Hardewig 1996), ist eine Reduktion im aeroben Metabolismus oder ein verstärkter anaerober Metabolismus (Guppy und Withers 1999, Michaelidis et al. 2007). Eine Reduzierung von Sauerstoffverbrauchsrate als Folge von hyperkapnischen Expositionen wurde in Invertebraten, wie beispielsweise *Sipunculus nudus* (Reipschläger und Pörtner 1996, Pörtner et al. 1998), *Mytilus chilensis* (Navarro et al. 2013), *Mytilus galloprovincialis* (Michaelidis et al. 2005) und *Littorina littorea* (Melatunan et al. 2011) festgestellt. Während einer längerfristigen hyperkapnischen Akklimation kann zudem ein Anstieg in Ammoniumexkretionsrate auf einen erhöhten Katabolismus von Proteinen und Aminosäuren hindeuten (Pörtner et al. 1998, Michaelidis et al. 2005). Eine andauernde Reduktion des Metabolismus, wie es bei einer chronischen Erhöhung des $p\text{CO}_2$ als Folge einer fortschreitenden Ozeanversauerung gegeben wäre, könnte somit zu einer chronischen Reduzierung von aeroben Kapazitäten, Wachstum (durch vermehrten Protein- und Aminosäurekatabolismus) und längerfristig zu einem Verlust der Fitness des Organismus führen (Langenbuch und Pörtner 2004, Melzner et al. 2009).

Ein erhöhter $p\text{CO}_2$ kann zudem Verhaltensänderungen, wie beispielsweise Beeinträchtigungen der olfaktorischen Wahrnehmung, Störungen von chemosensorischen Mechanismen, Veränderungen im Besiedlungsverhalten und in der Räuber-Beute-Interaktion, sowie Modifizierungen im Lernverhalten bei Fischen auslösen (Munday et al. 2009, Cripps et al. 2011, Devine et al. 2012a, Devine et al. 2012b, Ferrari et al. 2012, Allan et al. 2013, Jutfelt et al. 2013). Studien zum Einfluss von Ozeanversauerung auf das Verhalten von marinen Invertebraten sind hingegen rar. Eine Studie (Bibby et al. 2007) hat sich mit Verhaltensänderungen des Gastropoden *Littorina littorea* als Reaktion auf Akklimatisation bei erhöhtem $p\text{CO}_2$ beschäftigt: unter erhöhtem $p\text{CO}_2$ wurde ein Anstieg in der Vermeidereaktion gegenüber *Carcinus maenas* gemessen. de la Haye et al. (2012) konnten zudem zeigen, dass ein erhöhter $p\text{CO}_2$ die Chemorezeption des Einsiedlerkrebses *Pagurus bernhardus* beeinträchtigt.

Ein Effekt einer zunehmenden Unterschreitung der Calciumkarbonat-Sättigung und einer Reduktion von CO_3^{2-} während Ozeanversauerung ist eine negative Auswirkung auf Kalzifizierungsprozesse vieler Taxa. Reduzierte Kalzifizierungsrate sind bei Korallen (Gattuso et al. 1998, Schneider und Erez 2006, Maier et al. 2009, Ries et al. 2010), Krustenalgen und

kalkhaltigen Makroalgen (Martin und Gattuso 2009, Price et al. 2011), Foraminifera (Kuroyanagi et al. 2009, Lombard et al. 2010), Coccolithophoridae (Riebesell et al. 2000, Delille et al. 2005), Echinodermata (Clark et al. 2009), Pteropoda (Comeau et al. 2009, Lischka et al. 2011) und Bivalvia (Michaelidis et al. 2005, Beniash et al. 2010, Ries et al. 2009, Talmage und Gobler 2011, Gaylord et al. 2011, Gazeau et al. 2010, 2013, Range et al. 2012) nachgewiesen worden. Weitere Modifikationen in der Kalzifizierung embryonaler und larvaler Bivalvia sind beispielsweise Verluste der Schalenstabilität und Schalenmissbildungen (Gaylord et al. 2011, Andersen et al. 2013, Kurihara et al. 2008). Juvenile und adulte Bivalvia können auch äußere Auflösungserscheinungen der Schale zeigen (Thomsen et al. 2010, Welladsen et al. 2010). Eine unzureichende Nahrungszufuhr zuzüglich zu Ozeanversauerung kann sogar innere Schalenauflösungen verstärken (Melnzer et al. 2011). Effekte wie Schalenauflösung und reduziertes Schalenwachstum sind abhängig von dem vorherrschenden Calciumkarbonat-Polymorph. Organismen, die ihre Kalkstrukturen ausschließlich aus Aragonit aufbauen, sind, bedingt durch das während Ozeanversauerung frühzeitige Unterschreiten der Aragonitsättigung, besonders durch Schalenauflösungen betroffen. Zu diesen Organismen zählen beispielsweise Pteropoda (Feely et al. 2004, Lischka et al. 2011). Hingegen sind Organismen, deren Schalen von außen mit einer organischen Schicht, dem Periostracum, umgeben sind, weitgehend vor Korrosion und äußerer Schalenauflösungen geschützt (Rodolfo-Metalpa et al. 2011, Thomsen et al. 2010, Tunnicliffe et al. 2009).

Allgemein reagieren frühe Lebensstadien besonders sensitiv auf Ozeanversauerung (Kurihara 2008) und können Anomalien in ihrer Entwicklung zeigen. Dabei sind marine Invertebraten, die in ihren frühen Lebensstadien Biomineralisierung initialisieren, besonders beeinträchtigt (Ross et al. 2011). Verlangsamte Entwicklungen und verzögerte Übergänge in anschließende Larvenstadien sind für Echinodermata (Stumpp et al. 2011a, Martin et al. 2011, Gonzalez-Bernat et al. 2013), Crustacea (Findlay et al. 2009, Walther et al. 2010, Bechmann et al. 2011, Keppel et al. 2012) und Bivalvia (Watson et al. 2009, Gazeau et al. 2010, Kurihara et al. 2008, Talmage und Gobler 2011) beschrieben. Eine Erhöhung in larvalen Mortalitäten sind jedoch nur vereinzelt für Bivalvia bekannt (Watson et al. 2009, Talmage und Gobler 2011, Andersen et al. 2013).

Im Gegensatz zu Laborexperimenten, die Auswirkungen von erhöhtem $p\text{CO}_2$ auf einzelne Spezies untersuchen, können anhand von Regionen mit natürlichem lokal angesäuertem Meerwasser Effekte von Ozeanversauerung auf Ökosysteme untersucht werden. Beispiele für solche Regionen bilden die Gewässer vor Ischia (Italien) und nordwestlich vom Vulkan Eifuku (Japan), die von vulkanischen Zuströmen von CO_2 gekennzeichnet sind (Hall-Spencer et al. 2008, Tunnicliffe et al. 2009), und folglich einen starken Gradienten im Meerwasser-pH zeigen. Bedeutsame Effekte innerhalb dieser Ökosysteme sind Verluste der Biodiversität benthischer Arten mit zunehmend sinkendem pH, wobei kalzifizierende Arten

besonders betroffen sind (Hall-Spencer et al. 2008, Tunnicliffe et al. 2009, Cigliano et al. 2010, Kroeker et al. 2011).

1.3 Biomineralisierung

Die ältesten Spuren von Leben können anhand von Stromatolithen bis zu ca. 3,5 Milliarden Jahren zurückverfolgt werden (Walter et al. 1980, Lowe 1980). Biomineralisierung hingegen hat sich in der Zeitgeschichte relativ spät, vor ca. 740 Millionen Jahren (Proterozoikum), entwickelt (Knoll 2003). Die Entstehung von mineralisierten Skeletten vieler Gruppen fand nachfolgend statt und kann dem Kambrium zugeordnet werden (Knoll 2003). Eine Vielzahl von biogenen Mineralien (31) ist bekannt (Lowenstam und Margulis 1980): von diesen stellen Zwei-Drittel der Biomineralisierungsprodukte Calcium-haltige Minerale dar (Lowenstam 1981). Calciumkarbonate, Calciumphosphate und Silikate sind die drei Hauptklassen der Biominerale, die von vielen Eukaryonten synthetisiert werden (Knoll 2003).

Mollusken bilden ihre Skelette aus Calciumkarbonaten. Die Schalen der Miesmuschel *Mytilus edulis* sind aus den Polymorphen Aragonit und Kalzit aufgebaut (Abb. 1.4 Übersicht und Ausschnitt I). Bei Schalen, die aus beiden Polymorphen bestehen, befindet sich die aragonitische Perlmuttertschicht innenliegend und dem Tier zugewandt. Sie besteht aus flachen, rechteckigen, hexagonalen oder runden Plättchen mit einer Höhe von ca. 0,5 µm pro Plättchen (Marin et al. 2007). Die einzelnen CaCO₃-Plättchen sind bei Bivalvia wie in einer Mauer versetzt angeordnet (Erben 1972, Nakahara 1991). Die Schicht aus Kalzit besteht hingegen aus dünnen, prismatischen Nadeln, die an der sich im Wachstum befindlichen Region der Schale an der Innenseite des Periostracums sekretiert werden (Marin et al. 2007). Das Periostracum ist eine organische Schicht, die außen auf der Schale angelagert ist und während der Kalzifizierung als Nukleationsgrundlage eine initialisierende Funktion bei der Synthese von Kristallen übernimmt (Taylor und Kennedy 1969, Nakahara und Bevelander 1971, Petit et al. 1980, Checa 2000). Das Periostracum wird aus seinem löslichen Vorläufer Periostracin gebildet, welcher während des Gerbeprozesses durch das Enzym Tyrosinase zu Chinon oxidiert wird und nachfolgend vernetzt wird (Waite und Wilbur 1976, Waite et al. 1979, Waite und Andersen 1978, 1980, Waite 1983).

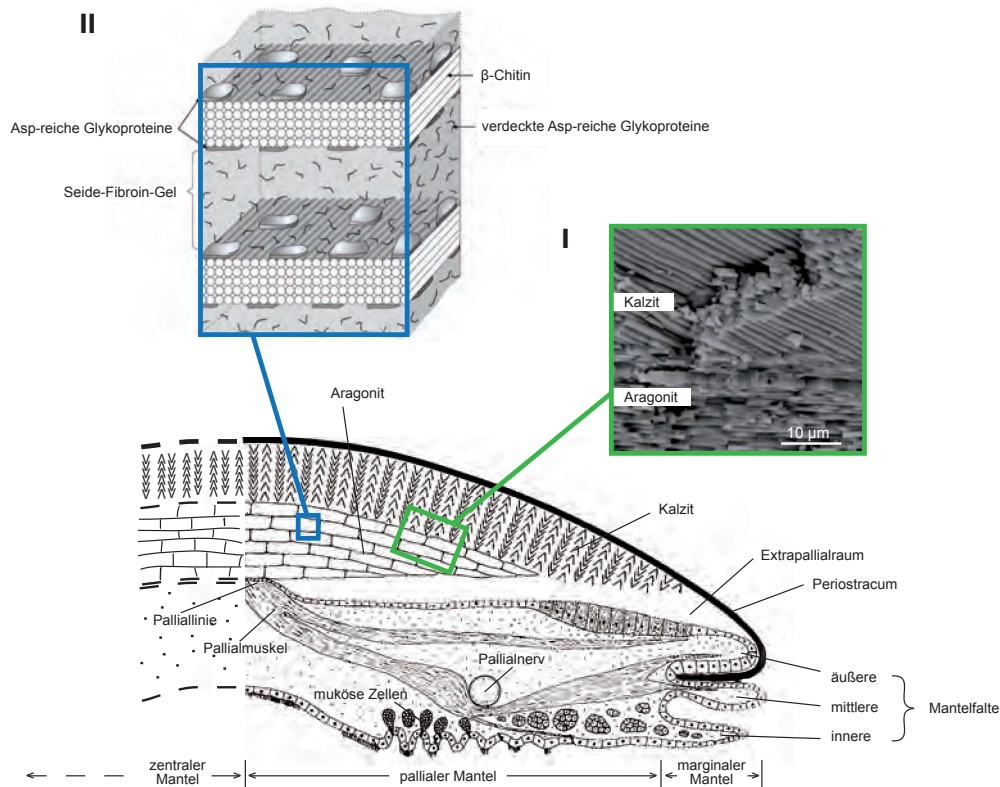


Abb. 1.4: Querschnitt durch Schale und Mantel einer Muschel aus der Klasse der Bivalvia (modifiziert aus: Wilbur und Saleuddin, 1983). Die einzelnen Komponenten sind nicht maßstabsgetreu gezeichnet. Die Positionen der Ausschnitte I und II sind in den Querschnitt eingefügt. Ausschnitt I stellt eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Polymorphen Kalzit und Aragonit der Schale von *Mytilus edulis* dar (modifiziert aus: Cusack und Freer, 2008), Ausschnitt II illustriert die Struktur der aragonitischen organischen Matrix aus *Atrina serrata* nach Demineralisierung (modifiziert aus: Levi-Kalishman et al., 2001).

Das im Biomineralisierungsprozess involvierte Gewebe ist der Mantel, welcher der Schale unterliegt (Yonge 1953, Beedham 1958, Abb. 1.4 Übersicht). Der Mantel besteht aus Bindegewebe, Muskeln und Nervenfasern und ist von einem einschichtigen Epithel umgeben (Wilbur und Saleuddin 1983) und kann in verschiedene Zonen unterteilt werden: 1. Mantelrand mit den drei Mantelfalten, 2. pallialer Mantel und 3. zentraler Mantel. Die drei Mantelfalten haben unterschiedliche Funktionen. Die innere und muskuläre Mantelfalte dient der Regulation des Wasserflusses in die Mantelhöhle, die mittlere besitzt sensorische Zellen und die äußere ist sekretorisch aktiv (Yonge 1948). Die inneren Epithelzellen der äußeren Mantelfalte sezernieren das Periostracum (Beedham 1958). Die äußere Epithelschicht der äußeren Mantelfalte, sowie die gesamte äußere, der Schalenseite zugewandte Epithelschicht des Mantels ist für die Bildung von Kalzit und Aragonit zuständig (Yonge 1953, Beedham 1958). Die äußere Epithelschicht des Mantels ist in zwei Bereiche eingeteilt, wobei die kolumnaren Zellen des Epithels Kalzit und die kuboiden Zellen Aragonit sezernieren (Beedham 1958). In *M. edulis* werden außerhalb der pallialen Linie, der Stelle, an der der Mantel über seine Muskeln an der Schale befestigt ist,

Aragonit, Kalzit und das Periostracum synthetisiert (Beedham 1958). Die Epithelzellen des zentralen Mantels fungieren hingegen im Aufbau von Aragonit.

McConnaughey und Gillikin (2008) haben ein Modell erstellt, in dem die potentiellen Transportwege von Ca^{2+} und HCO_3^- in den Extrapallialraum, dem Ort der Biomineralisierung, aufgezeigt sind. Demnach gelangen Ca^{2+} und HCO_3^- passiv über das Periostracum oder auf perizellulärem Transport durch das Mantelgewebe in den Extrapallialraum. HCO_3^- wird anschließend in der Extrapallialflüssigkeit (EPF) zu CO_3^{2-} deprotoniert. Zusätzlich diffundiert CO_2 durch den Mantel in die EPF und reagiert dort mit H_2O und OH^- zu CO_3^{2-} . Eine Erhöhung des pH der EPF fördert einen Anstieg von CO_3^{2-} . Gleichzeitig wird bei einer Alkalisierung vermehrt CO_2 zu HCO_3^- , katalysiert durch Carboanhydrasen, umgewandelt, sodass der Diffusionsgradient für einen Einstrom von CO_2 steigt. Der Anstieg des pH der EPF wird durch den Export der entstandenen Protonen aus der EPF im Austausch mit Ca^{2+} , im Verhältnis von 2 H^+ zu 1 Ca^{2+} , durch eine Ca^{2+} -ATPase energetisch katalysiert.

Alternativ wird die Anreicherung und der Transport von Ca^{2+} und CO_3^{2-} in intrazellulären Vesikeln zur Kalzifizierungszone diskutiert. Hierbei werden die Ionen aus dem Meerwasser oder den Körperflüssigkeiten aufgenommen und zunächst in den Vesikeln in einer ungeordneten festen Phase (amorphous calcium carbonate, ACC) ankonzentriert. Diese Phase wird zur Kalzifizierungsstelle transportiert und dort destabilisiert, sodass eine Kristallisierung erfolgen kann (Weiner und Addadi 2011). Eine Bildung von transientem ACC wurde beispielsweise bei der Kalzifizierung von Larven und adulten Seeigeln als Vorläufer von Kalzit entdeckt (Beniash et al. 1997, Politi et al. 2004). Für Mollusken ist die Synthese von ACC sowohl in frühen Lebensstadien als auch in adulten Tieren verschiedener Arten wie *Mercenaria mercenaria*, *Crassostrea gigas*, *Haliotis laevis*, *Hyriopsis cumingii* und *Diplodon chilensis* nachgewiesen und gilt als transiente Phase für Aragonit (Weiss et al. 2002, Nassif et al. 2005, Jacob et al. 2011).

Mount et al. (2004) konnten zudem zeigen, dass Calciumkarbonat-Kristalle in granulozytischen Hämozyten der Auster vorhanden waren. Da sich diese Zellzahlen nach Beschädigung der Schale erhöhten, wiesen die Autoren diesen Hämozyten eine entscheidende Rolle im Transport von CaCO_3 zur Kalzifizierungsseite zu.

Da spontane Kalzifizierung von Zellen und Geweben auf Grund von stark übersättigten Ozeanen des Proterozoikums möglicherweise problematisch war (Grotzinger 1989, Knoll et al. 1993), schlussfolgerten Marin et al. (1996), dass sich schon frühzeitig molekulare Inhibitoren zur physiologischen Kontrolle von Kalzifizierung entwickelt haben. Zuständig hierfür ist bei der Schalenbildung die organische Matrix, die ca. 0,1-5% der Schalenmasse beträgt und aus löslichen und unlöslichen Komponenten besteht (Kawaguchi und Watabe 1993, Marin et al. 2007). Die möglichen physikochemischen Funktionen, die dieser Matrix zugeschrieben werden, reichen von der Konzentrierung der Vorläufer-Ionen, Bildung einer drei-dimensionalen

Struktur, Vorlage und Nukleationsgrundlage während Kristallisierung, Kontrolle von Wachstum der Kristalle (Marin et al. 2007) bis hin zur Selektion des Calciumkarbonat-Polymorphs (Falini et al. 1996). Bestandteile der organischen Matrix sind Polysaccharide, wie beispielsweise β -Chitin (Weiner und Traub 1980), Lipide (Rousseau et al. 2006, Farre und Dauphin 2009) sowie lösliche und unlösliche Matrixproteine (z.B. Weiner und Hood 1975, Weiner 1979, Gotliv et al. 2005, Suzuki et al. 2009, Yano et al. 2006, Sudo et al. 1997), die von extrem sauer ($pI < 4,5$) hinzu basisch reichen ($pI > 7,0$) (Marin et al. 2007). β -Chitin gibt die Gesamtstruktur der interlamellaren Matrix vor (Levi-Kalisman et al. 2001). Die Funktion von Lipiden, die nur in geringem Anteil vorkommen, ist bisher unbekannt (Farre und Dauphin 2009). Lösliche Matrixproteine sind durch einen hohen Anteil an Asp (Asparaginsäure) (Weiner 1979) gekennzeichnet. Zu diesen gehören beispielsweise die Proteine Asprich der prismatischen Matrix, deren saure Domäne 1 starke Homologie zu Calsequestrin, einem Calcium-bindenden Protein, zeigt (Gotliv et al. 2005) und deren C-Terminus verantwortlich für unregelmäßiges Kristall-Wachstum ist (Collino et al. 2006). Andere lösliche Matrixproteine weisen einen hohen Anteil an Ser (Serin), Gly (Glycin) zusammen mit Asp auf (Weiner und Hood 1975, Crenshaw 1972). Zu dieser Gruppe zählt MSP-1 aus Kalzit, dessen Repeat-Domäne von Ser, Gly und Asp ebenfalls Calcium-bindende Eigenschaften besitzen soll (Sarashina und Endo 2001). Nacrein, ein lösliches Protein der aragonitischen Matrix, verfügt über eine Carboanhydrase-Domäne, die durch eine Gly-X-Asn (Asparagin) repetitive Sequenz unterbrochen ist, und weist eine inhibierende Funktion bei der Biomineralisierung auf (Miyamoto et al. 1996, Miyamoto et al. 2005). Desweiteren finden sich in der löslichen Fraktion der Matrix sulfatierte Glykoproteine (Crenshaw 1972), die möglicherweise in der Nukleation der mineralischen Phase involviert sind (Nudelman et al. 2006).

Unlösliche Matrixproteine sind durch einen bedeutsamen Anteil an Gly charakterisiert (Meenakshi et al. 1971, Gregoire 1972). Zu diesen Proteinen zählen beispielsweise Shematrine, die zunächst in der prismatischen Schicht nachgewiesen wurden (Yano et al. 2006), aber auch eine wichtige Rolle bei der Synthese von Aragonit zu spielen scheinen (Jackson et al. 2010). Ein weiterer Bestandteil der unlöslichen Matrix ist der Pif-Komplex aus der aragonitischen Matrix von *Pinctada fucata*. Dieser besteht aus den Proteinen Pif 80, dessen hoher Anteil an Asp mit einer Bindung von Aragonit in Beziehung stehen soll, und Pif 97, das eine Chitin-bindende Domäne besitzt (Suzuki et al. 2009). Seide hingegen macht den größten Anteil der unlöslichen Gly-reichen Matrixproteine der aragonitischen Schicht aus (Addadi et al. 2006).

Bereits 1957 zeigte Gregoire die Komplexität der organischen aragonitischen Matrix. Später haben Levi-Kalisman et al. (2001) anhand von cryo-TEM-Untersuchungen ein Modell des Aufbaus der organischen Matrix in der Perlmuttertschicht von *Atrina serrata* erstellt. Demnach dient das Polysaccharid β -Chitin als Gerüst, welches die Orientierung der entstehenden Kristalle organisiert. Zwischen zwei interlamellaren β -Chitin-Schichten befindet sich eine hydratisierte

Gel-Phase aus Seide-Fibroin, in die Asp-reiche saure Glykoproteine eingelagert sind (Abb 1.4 Ausschnitt II). Asp-reiche Proteine mögen funktional an dem Transport von Ca^{2+} zur Kalzifizierungsstelle bei gleichzeitiger Entfernung von H^+ beteiligt sein (Weiss 2010). Durch die Entdeckung des Pif-Komplexes konnte das Verständnis über den Aufbau der organischen Matrix und die Synthese von Aragonit erweitert werden. Weiss (2010) sprach dem Pif-Komplex eine zentrale Rolle bei der Perlmutterbildung zu, da durch eine mögliche dreidimensionale Ausrichtung des Komplexes mit Chitin die spezifische Synthese von Aragonit begünstigt wird.

Addadi et al. (2006) haben folgende zeitliche Abfolge für den Prozess der Biomineralisierung im Perlmutter vorgeschlagen: 1. Assemblierung der Matrix (Sezernierung von Chitin und Matrixproteinen durch den Mantel), 2. initiale Bildung der mineralischen Phase (ACC), 3. Nukleierung einzelner Aragonit-Plättchen, 4. Wachstum einzelner Plättchen (zunächst vertikal bis zur Chitin-Schicht, dann lateral). Trotz der vielen Erkenntnisse, die zum Verständnis der Biomineralisierung und Synthese einzelner Schalen-Komponenten beigetragen haben, ist der Prozess der Kalzifizierung und dessen Regulation weit davon entfernt, umfassend verstanden zu sein.

1.4 Entwicklung, Verbreitung und Relevanz der Miesmuschel *Mytilus edulis*

Die Miesmuschel *Mytilus edulis* gehört innerhalb der Familie der Mytilidae zur Klasse der Bivalvia und zum Stamm der Mollusca. Wenn die Muscheln geschlechtsreif sind, geben sie Gameten ins Wasser ab. Nach der Fertilisation bildet sich zunächst ein cilierter Embryo aus, der sich innerhalb eines Tages zu einer beweglichen Trochophora-Larve entwickelt. Die nächste Entwicklungsphase stellt die Veliger-Larve dar, die sich bereits ernähren kann. Zunächst bildet sich eine Prodissoconch I-Muschelschale aus, im weiteren Verlauf eine Prodissoconch II-Schale, die durch Ausbildung des Umbos gekennzeichnet ist. Die Larven werden passiv im Wasserstrom getragen und nehmen zunächst als Pediveliger mit dem Fuß Kontakt mit dem Substrat auf, bevor sie sich als Plantigrade in einer primäre Besiedlung mittels Byssus-Fäden am Substrat befestigen. Nachdem die Juvenile eine Größe von ca. 1,5 mm erreicht haben, lösen sie sich vom Substrat, werden erneut passiv im Wasserstrom getrieben und lassen sich schlussendlich während der sekundären Besiedlung mit ihren Byssus-Fäden an erwachsenen Muscheln nieder (Referenz für die Entwicklungsphasen: Newell 1989).

Miesmuscheln sind in Ozeanen der nördlichen und südlichen Hemisphäre beheimatet (Soot-Ryen 1955), leben sowohl innerhalb der Gezeitenzone als auch subtidal, bilden Muschelkolonien an Felsen sowie Bänke im offenen Meer oder lassen sich auch an künstlichen Substraten wie Stegen nieder. Ihre großräumige Verbreitung ist darauf zurückzuführen, dass *M. edulis* Fluktuationen in Salinitäten von ca. 5-40 PSU (Remane 1971, Brenko und Calabrese 1969, Westerbom et al. 2002) und Wassertemperaturen zwischen -20°C (Kanwisher 1955,

Williams 1970) und 30°C (Brenko und Calabrese 1969, Widdows 1973) standhalten kann. Jedoch können niedrige Salinitäten zu einem verlangsamten Schalenwachstum (Westerbom et al. 2002), zu reduzierten Schalenmassen bei gleicher Größe (Remane 1971) und zu einer Verzögerung in der frühen Ontogenese (Qui et al. 2002) führen. Das Überleben von Larven kann außerdem durch erhöhte Wassertemperaturen negativ beeinflusst werden (Brenko und Calabrese 1969).

In ihren Habitaten dominiert die Miesmuschel und kann bis zu 97% der Biomasse in der Artengemeinschaft einer Muschelbank ausmachen (Asmus 1987). Eine starke Populationsdichte ist darauf zurückzuführen, dass *M. edulis* nur wenige natürliche Fraßfeinde hat (z.B. in der Kieler Bucht hauptsächlich die Strandkrabbe *Carcinus maenas*, den Seestern *Asteria rubens* und die Wellhornschnecke *Littorina littorea*), und dass sie unbeweidete Regionen schnell besiedeln kann (Enderlein und Wahl 2004). Durch Filtration, Nahrungsmittelverwertung und anschließender Exkretion von Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphat agiert die Miesmuschel als wichtiges Verbindungsglied zwischen pelagischen und benthischen Ökosystemen (Kautsky und Evans 1987). Darüber hinaus fördert die Besiedlung von Lebensräumen durch *M. edulis* die Artenvielfalt von Makrofauna und -flora (Norling und Kautsky 2007).

Zusätzlich zu ihrer Relevanz als "Engineering Species" innerhalb ihres Ökosystems ist die Miesmuschel für den Menschen von ökonomischer Relevanz, da sie global als Delikatesse vertrieben wird. Um diesem Umstand gerecht zu werden, wird sie in Aquakulturen, die vorherrschend in Europa und Nordamerika zu finden sind, produziert. Seit 1950 stieg daher die globale Produktion von *M. edulis* aus Aquakulturen von ca. 49.000 t auf 176.000 t im Jahr 2011 an (FAO).

M. edulis kann auch Hybrid-Populationen mit anderen *Mytilus*-Arten bilden. In Gewässern um Südwest-England finden sich beispielsweise Hybrid-Populationen aus *M. edulis* und *M. galloprovincialis* (Hilbish et al. 2002). An der West- und Ostküste des atlantischen Ozeans hybridisieren *M. edulis* und *M. trossulus* (Riginos und Cunningham 2004). In der Ostsee gibt es ebenfalls Mischpopulationen aus *M. edulis* und *M. trossulus* (Stuckas et al. 2009). Die Regionen der Kieler Bucht sind mit Muscheln, die vorwiegend *M. edulis* typische Allele tragen, besiedelt (Stuckas et al. 2009).

1.5 Ostsee und Kieler Förde

Die Ostsee erstreckt sich innerhalb Europas von 54°N bis 66°N über milde und feuchte bis hin zu subarktischen Klimazonen (Krauss 2001). Sie ist ein halbumschlossenes Binnengewässer, das nur im Westen über die dänischen Meerengen Kontakt zur angrenzenden Nordsee hat. Durch einen Salinitätsunterschied von Nord- zu Ostsee wird ein Eintrag von Meerwasser aus der Nordsee über das Kattegat in die brackige Ostsee angetrieben (Krauss 2001). Im Nordosten hingegen strömt Frischwasser aus Flüssen ein. Durch diese Umstände

nehmen die Salinitäten des Oberflächenwassers vom Westen mit ca. 21 PSU zum Nordosten hin auf ca. 2 PSU ab (Kautsky 1989, Lehmann et al. 2002). Dieser hohe Salzgradient der Ostsee gibt daher sowohl Salz- als auch Süßwasserorganismen einen Lebensraum (Kautsky 1989).

Die Kieler Förde ist der südlichste Bereich der Kieler Bucht und erstreckt sich von der Hörn im Stadtzentrum Kiels bis zur Außenförde. Durch die Nähe zum Kattegat weist die Kieler Förde einen relativ hohen, aber auch variablen Salzgehalt über das Jahr von ca. 14 bis ca. 22 auf (Thomsen et al. 2010). In den Sommermonaten liegt ihre Oberflächentemperatur bei ungefähr 19°C, in den Wintermonaten sinkt sie auf bis zu 3°C ab (Thomsen et al. 2010). Im Frühjahr beträgt der $p\text{CO}_2$ der Kieler Förde ca. 390 μatm und kann, bedingt durch Auftrieb von CO_2 -reichen Wassermassen aus der Tiefe, Werte von bis zu 2300 μatm in Sommer- und Herbstmonaten erreichen (Thomsen et al. 2010). Trotz der starken Schwankungen im $p\text{CO}_2$, die eine wiederkehrende Untersättigung für Aragonit und teilweise auch für Kalzit bedingen, wird dieser Lebensraum von kalzifizierenden Organismen wie z.B. *M. edulis*, der Seepocke *Amphibalanus improvisus* und der Strandkrabbe *Carcinus maenas* dominiert (Enderlein und Wahl 2004, Thomsen et al. 2010).

1.6 Fragestellungen und experimentelles Vorgehen

In dieser Arbeit erfolgen Analysen von möglicherweise bei der Kalzifizierung beteiligten Genen sowie mechanistische Studien, die beleuchten sollen, welche Gene zu welchem Zeitpunkt eine Rolle bei der Biomineralisierung spielen. Außerdem wird der Einfluss von erhöhtem $p\text{CO}_2$ auf das Transkriptom von zentralem und pallialem/marginalem Mantel, sowie auf das Proteom von pallialem/marginalem Mantel und Kieme untersucht. Als Grundlage für die transkriptomischen Studien wurde zunächst ein Transkriptom aus dem zentralen und pallialen/marginalen Mantel, den im Energiemetabolismus und der Biomineralisierung involvierten Geweben, erstellt. Zusätzlich werden physiologische Prozesse, wie Sauerstoffverbrauch, Kalzifizierung, Ammoniumexkretion, Filtration und Wachstumsvermögen nach 1-jähriger Inkubation von Muscheln bei erhöhtem $p\text{CO}_2$ analysiert und mit molekularen und biochemischen Grundlagen integrativ verknüpft, um ein Gesamtbild der verschiedenen Regulationsstufen (physiologische Kapazitäten, Protein- und Genexpression) unter Ozeanversauerung zu erhalten.

Dabei stehen folgende Fragen im Fokus dieser Arbeit:

Welche Gene, die bei der Biomineralisierung möglicherweise eine Rolle spielen, sind im Mantel-Transkriptom vorhanden und wie können diese charakterisiert werden? Bei welchem Syntheseschritt sind ausgewählte Transkripte während des Kalzifizierungsprozesses in *M. edulis* exprimiert? Erfolgt eine Transkriptionsinitialisierung abhängig von der Regenerationszeit in den Mantelregionen, die unter beschädigten Schalenstellen liegen?

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurde das Manteltranskriptom zunächst nach hochexprimierten (>100 Reads pro Million pro Contig) und spezifischen ($>10\times$ höher exprimiert verglichen zum Gewebemix aus Kieme, Fuß, Adduktormuskel und Mitteldarmdrüse) Mantelrand-Transkripten durchsucht. Zur Analyse von Regenerationszeit-abhängiger Expression von Genen wurde jeweils eine Schalenseite pro Muschel mehrmals angebohrt. An drei Zeitpunkten wurden die zentrale Mantelzone, sowie pallialer/marginaler Mantelbereich beider Schalenseiten entnommen und für Genexpressionsstudien mittels quantitativer *Real-time*-PCR eingesetzt. Vergleiche der Genexpression erfolgten zwischen den beiden Schalenseiten und abhängig von der Regenerationszeit. Die Auswahl der zu untersuchenden Transkripte wurde unter Zuhilfenahme des zuvor erstellten Transkriptoms aus Mantelgewebe vorgenommen und durch folgende Aspekte bestimmt: 1. ausschließliche, bzw. vermehrte Expression im Mantelrand und/oder 2. mögliche Beteiligung am Biomineralisierungsprozess. Komplementiert wurde die Genexpressionsstudie durch Analysen der Schalen (stereomikroskopisch, rasterelektronenmikroskopisch, Raman-spektroskopisch) während der Regeneration.

Wie ist die Expression von Genen, die eine Rolle in der Biomineralisierung, im Metabolismus und in der Stressantwort spielen, im Mantelgewebe von *M. edulis* durch erhöhten $p\text{CO}_2$ im Langzeitexperiment von 8 Wochen beeinflusst?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Genexpressionsstudien anhand von quantitativer *Real-time*-PCR durchgeführt. Als Gewebe dienten zentrale und palliale/marginale Mantelregionen. Für die Fragestellung wurden Gene, die in die Kategorien aerober/anaerober ATP-Umsatz, Zitratzyklus/Aminosäuremetabolismus, Synthese organischer Matrix, $\text{Ca}^{2+}/\text{HCO}_3^-$ -Haushalt, Stressantwort und Sonstige gehören, spezifisch aus dem Manteltranskriptom ausgewählt. Diese Analysen erfolgten im Anschluss an eine physiologische Studie von Tieren derselben Inkubation, bei denen eine $p\text{CO}_2$ -abhängige verringerte Kalzifizierung und Erhöhung der Ammoniumexkretion sowie ein Anstieg im Sauerstoffverbrauch unter moderatem $p\text{CO}_2$ gemessen worden waren (Thomsen und Melzner 2010). Die vorliegende Arbeit sollte daher die molekularen Grundlagen dieser physiologischen Änderungen beleuchten.

Wie wirkt sich ein erhöhter $p\text{CO}_2$ in einer Langzeitinkubation von einem Jahr auf das Energiebudget von *M. edulis* aus? Finden sich Modifikationen in der Proteinexpression, die mit der Ganztier-Antwort verknüpft werden können?

Für die Beantwortung dieser Fragestellungen wurden sessile Larven von *M. edulis* gesammelt und für ein Jahr unter verschiedenen $p\text{CO}_2$ inkubiert. Im Anschluss daran wurden Sauerstoffverbrauch, Kalzifizierung, Filtration, Ammoniumexkretion und das Wachstumsvermögen der Tiere bestimmt. Da Kalzifizierung und Filtration durch erhöhten $p\text{CO}_2$ negativ beeinflusst waren, wurden die in diese Prozesse involvierten Gewebe - Mantelrand und Kieme - für proteomische Studien eingesetzt, um mögliche Änderungen in den Proteinabundanz zu detektieren.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstier

Für die Experimente wurden *Mytilus edulis* der Kieler Förde (54°19.8'N; 10°9.0'O) benutzt. Die Tiere wurden entweder mit der Hand oder mit einem Muschelkratzer aus dem Sublittoral entnommen (Publikation I und II). Frisch angesiedelte Larven wurden mit Hilfe von PVC-Platten, die in ca. 1 m Tiefe in die Förde gehängt waren, gesammelt (Publikation III).

2.2 Experimenteller Aufbau

Zur Bearbeitung der experimentellen Fragestellungen wurden Muscheln zunächst entweder in Freilandinkubationen in der Kieler Bucht (Publikation I, Inkubation I) eingesetzt oder in Aquarien mit verschiedenen $p\text{CO}_2$ -Werten in Klimakammern (GEOMAR, Kiel) akklimiert (Publikation II und III, Inkubation II und III).

2.2.1 Freilandinkubation zur Analyse der Schalenregeneration (Inkubation I)

M. edulis mit einer mittleren Schalenlänge von 49 ± 2 mm wurden an drei Zeitpunkten im April 2011 gesammelt. In jede linke Schalenhälfte wurden zentral unter Verwendung eines elektrischen Bohrers (N 62/E, Proxxon, Niersbach, Deutschland) 9 Löcher in einem orthogonalen 3 x 3 Design mit einem Durchmesser von 1 mm gebohrt. Anschließend wurden die Muscheln in Netzkäfigen mit einer Maschenstärke von 15 mm in die Kieler Bucht überführt. Das Experiment dauerte 41 Tage. 6 Muscheln wurden jeweils nach Tag 20, 29 und 36 geöffnet, und der zentrale und palliale/marginale Mantel beider Schalenseiten wurde für quantitative *Real-time*-PCR-Analysen entnommen. Die Schalen der angebohrten Seiten dienten stereomikroskopischen, rasterelektronenmikroskopischen und Raman-spektroskopischen Analysen (Abb. 2.1).

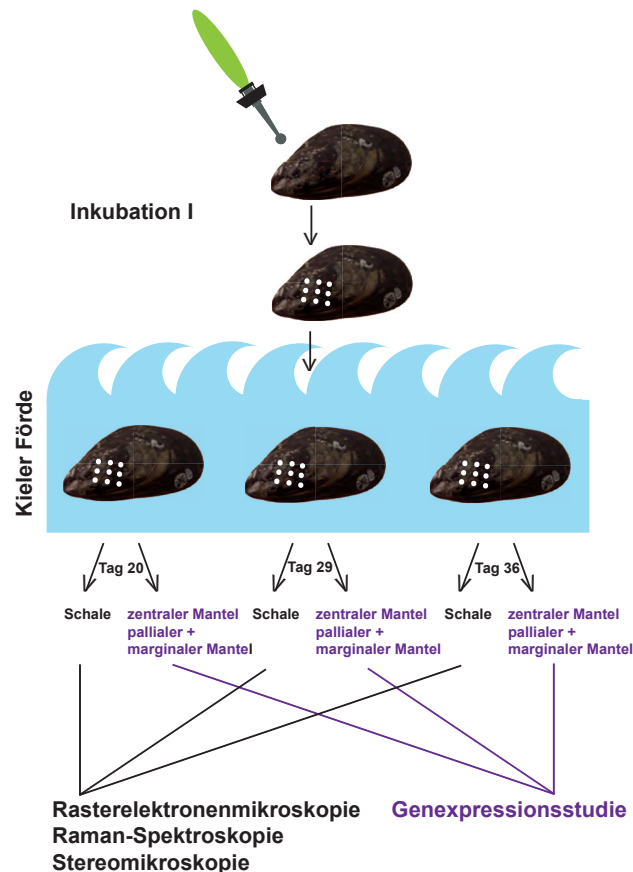


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Inkubation I mit Angabe des Verwendungszwecks des jeweiligen Probenmaterials.

2.2.2 Inkubationen unter Laborbedingungen zum Einfluss von Ozeanversauerung (Inkubationen II und III)

Für die Genexpressionsstudie (Publikation II, Inkubation II) wurden subtidale Muscheln von Oktober bis Dezember 2009 in 16 Aquarien (Volumen = 16 l) in einem Durchflusssystem gehältert (siehe Thomsen und Melzner 2010). Hierfür wurde UV-bestrahltes und 5 μm -gefiltertes Meerwasser aus einem Vorrattank mit einer Durchflussrate von 50 ml min^{-1} und Becken in die einzelnen Aquarien geführt. Vier verschiedene $p\text{CO}_2$ -Werte (500, 900, 2000 und 3700 μatm ; jeweils vier Pseudoreplikate) wurden mittels automatischer Gasmischung (Linde Gas & HTK Hamburg, Deutschland) eingestellt. Nach Beendigung der Inkubation wurden zentrale Mäntel und palliale/marginale Mäntel der Muscheln präpariert, um diese für quantitative *Real-time*-PCR-Studien und zur Erstellung eines Transkriptoms zu verwenden (Abb. 2.2 oben).

Für die Untersuchung von Langzeiteffekten auf die Physiologie und Proteinexpression (Publikation III, Inkubation III) wurden frisch angesiedelte Larven im Juli 2010 von 5 x 5 cm PVC-Platten, die in der Tiefe von 1m in der Kieler Förde ausgehängt waren, ebenfalls in 16 Aquarien überführt. In der 12-monatige Inkubation von August 2010 bis August 2011 betrugen die $p\text{CO}_2$ -Werte 600, 1300, 2400 und 4200 μatm in jeweils 4 Pseudoreplikaten. Bei dieser Inkubation wurde der Durchfluss auf 100 ml min^{-1} und Becken justiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden Sauerstoffverbrauchsraten, Kalzifizierung, Ammoniumexkretion, Filtrationsrate und Wachstumsvermögen der Muscheln bestimmt, sowie Kiemengewebe und palliale/marginale Mäntel für proteomische Studien präpariert (Abb. 2.2 unten).

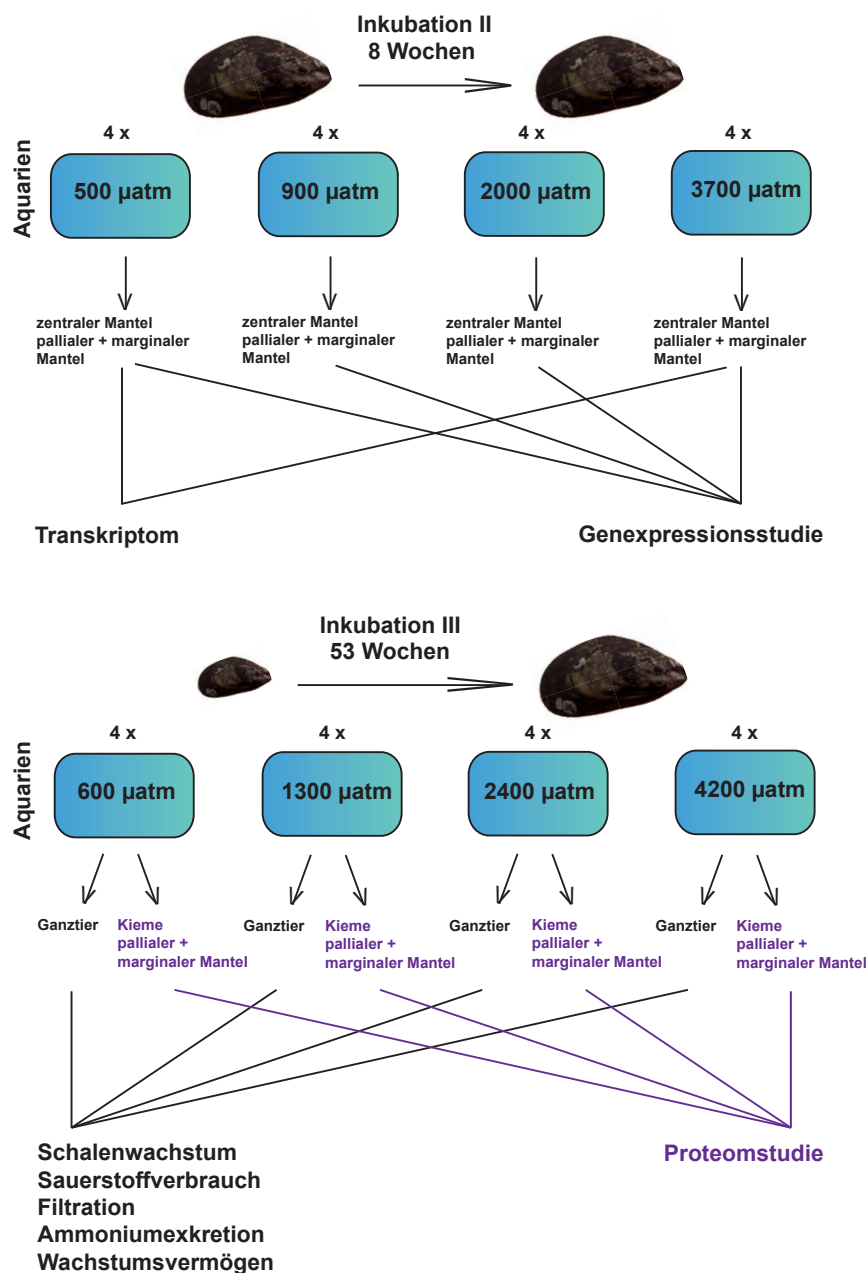


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Inkubationen II (oben) und III (unten) mit Angabe des Verwendungszwecks des jeweiligen Probenmaterials. Je CO_2 -Stufe wurden Muscheln in 4 Replikat-Becken inkubiert.

2.2.3 Bestimmung der Wasser-Parameter

Salinität, Temperatur und pH_{NBS} wurden in jeder der Inkubationen I-III gemessen. Zur Ermittlung der Salinität und Temperatur wurde ein WTW Cond 315i-Salinometer mit WTW TETRACON 325 Sonde, zur Bestimmung des pH ein WTW 340i pH-Meter mit WTW SenTix 81-Elektrode, die mittels Radiometer IUPAC Precision pH-Puffer 7 und 10 (S11M44, S11M007) kalibriert wurde, benutzt. Zusätzlich wurden in den Inkubationen II und III der Anteil an totalem gelösten inorganischen Kohlenstoff (C_T) mit einem AIRICA Autoanalysator (Marianda GmbH, Kiel, Deutschland) und einer Präzision von $2\text{--}4\ \mu\text{mol kg}^{-1}$ Seewasser bestimmt. Die Karbonatchemie des Meerwassers wurde aus pH_{NBS} oder der totalen Alkalinität (A_T) und C_T unter Verwendung von CO2SYS mit Dissoziationskonstanten aus Roy et al. (1993) berechnet. Die Genauigkeit der Messung von C_T wurde durch zertifizierte Referenzmaterialien von Andrew Dickson (<http://andrew.ucsd.edu/co2qc/>) gewährleistet.

2.2.4 *Rhodomonas*-Anzucht und Fütterung der Muscheln

Rhodomonas-Zellen wurden in 7 l $0,2\ \mu\text{m}$ -gefiltertem und mit Provasolis-Medium (Ismar et al. 2008) angereichertem Meerwasser kultiviert. 5 ml $0,2\ \mu\text{m}$ -filtrierter Lösung von Kaliumdihydrogenorthosphat und Ammoniumnitrat wurden in einer finalen Konzentration von jeweils $0,036\ \text{mmol l}^{-1}\ \text{P}$ und $0,55\ \text{mol l}^{-1}\ \text{N}$ hinzugegeben. Die Kulturen wurden bei 20°C und ständiger Beleuchtung angezogen.

Die Fütterung der Muscheln (Inkubationen II und III) erfolgte kontinuierlich mit 7 l *Rhodomonas spec.*-Kulturlösung pro Tag im Durchfluss. *Rhodomonas*-Zellzahlen wurden wöchentlich mittels eines Coulter Counters (Z2, Beckman CoulterTM) bestimmt. Diese fielen pro Aquarium in beiden Inkubationen nicht unter eine Konzentration von $1500\ \text{Zellen ml}^{-1}$.

2.3 Bestimmung von Ganztier-Parametern

2.3.1 Sauerstoffverbrauch

Messungen zur Bestimmung von Respirationsraten wurden in 100 ml-fassenden Plexiglas-Kammern, die in einem Messkreis angeschlossen waren, durchgeführt. Leere Kammern dienten der Bestimmung von bakterieller Respiration. Zunächst wurden die Kammern in ein 100 l-fassendes Wasserbad platziert und mit $0,2\ \mu\text{m}$ -gefiltertem und UV-bestrahltem Meerwasser gefüllt, welches zuvor entsprechend dem benötigten $p\text{CO}_2$ -Wert äquilibriert war. Das Wasser innerhalb der Respirationskammern wurde mittels einer Peristaltikpumpe (MCP ISM 404, Ismatec, Schweiz) mit einer Rate von $2\ \text{ml sec}^{-1}$ zirkuliert. Die Abnahme der Sauerstoffkonzentration im geschlossenen Messkreis wurde über einen Zeitraum von 15 min aufgezeichnet, wobei die Sauerstoffkonzentrationen im Abstand von 15 sec mit einem Sauerstoff-Sensor aus Glasfaser (Sauerstoff-Optode, Presens, Regensburg, Deutschland)

ermittelt wurden. Anschließend wurden die Versuchskammern für 15 min mit frischem Wasser aus einem Reservoir gespült. Die Sauerstoffkonzentration sanken niemals tiefer als 90% der Luftsättigung. Pro Aquarium wurden jeweils zwei unabhängige Messungen durchgeführt. Für jede Messung wurden drei Muscheln willkürlich pro Aquarium ausgewählt und für 1 h in den Versuchskammern akklimatisiert. Während jeder Messreihe wurde die Abnahme der Sauerstoffkonzentration in drei Replikaten bestimmt. Für die Berechnung der Respirationsraten wurden die Sauerstoffkonzentrationsabnahmen beider Läufe für jedes Replikat gemittelt. Molare Sauerstoffverbrauchsrate (MO_2) wurden als $\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$ pro schalenfreie Trockenmasse (SFDM) h^{-1} angegeben.

2.3.2 Ammoniumexkretion

Ammoniumexkretionsraten wurden aus dem Meerwasser in den Respirationskammern berechnet. Ammoniumkonzentrationen wurden nach Holmes et al. (1999) bestimmt. 4 ml Seewasserproben wurden vor und nach dem Messen der Sauerstoffverbrauchs aus jeder Respirationskammer entnommen, und mit 1 ml Reagenz aus 1,49 mM Orthophaldialdehyd, 0,063 mM Natriumsulfit und 21 mM Natriumborat versetzt. Nach einer Inkubation von 2 h in der Dunkelheit wurden die Proben mit einem Kontron SFM25 Fluorometer bei einer Anregung von 366 nm und einer Emission von 422 nm gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit Ammoniumkonzentrationen von 0, 5 und 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Ammoniumexkretionsraten (NH_4^+) wurden als $\text{NH}_4^+ \text{ g}^{-1}$ SFDM h^{-1} dargestellt.

2.3.3 Filtration

Filtrationsraten wurden von Tieren in 2 l-fassenden Aquarien mit 0,2 μm -gefiltertem Meerwasser und dem entsprechend eingestellten $p\text{CO}_2$ -Wert gemessen, indem die Abnahme von *Rhodomonas*-Zellen pro Aquarium über einen Zeitraum von 30 min ermittelt wurde. Die Muscheln wurden 1 h bevor das Experiment durch Zugabe von 6000 Zellen ml^{-1} initialisiert wurde, in die Aquarien gesetzt. Nach jeweils 5 min wurde eine Wasserprobe von 20 ml entnommen, und die Zellzahlen wurden mit einem Coulter Counter bestimmt. Um eine Einschränkung der Filtration durch Reduzierung der Zellzahlen zu verhindern, wurde eine *Rhodomonas*-Konzentration von mindestens 1500 Zellen ml^{-1} während des Experimentes sichergestellt (Riisgård und Randløv 1981). In Aquarien ohne Muscheln wurden Kontrollwerte ermittelt.

2.3.4 Wachstumsvermögen (*Scope for Growth*)

Das Wachstumsvermögen der Muscheln wurde aus der gesamten Energieaufnahme durch Filtration abzüglich des Energieverlusts durch Respiration und Ammoniumexkretion berechnet. Energieverluste wurden durch Umwandlung von Sauerstoffverbrauch und Ammoniumexkretionsraten in J g^{-1} SFDM h^{-1} ermittelt, wobei ein oxykalisches Äquivalent

von $0,44 \text{ J } \mu\text{mol O}_2^{-1}$ und ein Energiewert von $0,347 \text{ J } \mu\text{mol}^{-1} \text{NH}_4^+$ als Umwandlungsfaktoren benutzt wurden. Die Energieaufnahme wurde aus der Filtrationsrate, einer Assimilierungseffizienz von 80% (Kjørboe et al. 1981) und einer mittleren *Rhodomonas*-Konzentration von $2000 \text{ Zellen ml}^{-1}$ während der Inkubationen berechnet. Der Energiegehalt pro *Rhodomonas*-Zelle wurde anhand ihres Kohlenstoffgehalts (45 pg Zelle^{-1} , Thomsen et al. 2013) und einem Konversationsfaktor von 46 J mg^{-1} Kohlenstoff (Salonen et al. 1976) berechnet.

2.4 Schalenanalyse

Neugebildete Schalenkomponenten wurden im Rahmen der Rekalzifizierungsstudie (Publikation I) analysiert. Zunächst wurden die Schalen in vier Reparatur-Stadien eingeteilt: keine Reparatur-Anzeichen (I), initiale Bildung von organischem Material (II), Erhöhung der Rigidität des organischen Materials und Bildung von vereinzelt Kalzit-Kristallen auf der organischen Schicht (III) und Bildung von Kalzit- und Aragonit-Kristallen auf der organischen Schicht (IV). Für jedes Stadium und jeden Zeitpunkt wurde je ein repräsentatives Foto, das den Rekalzifizierungsprozess der inneren Schalenoberfläche dokumentiert, mit einer Spiegelreflex-Kamera (CANON EOS 100D, Krefeld, Deutschland) aufgenommen. Detailliertere Bilder wurden mit einem Stereomikroskop (Wild M8, Wild Heerbrugg, Vergrößerung 6-50fach), einer CCD-Kamera (Jenoptic ProgRes CF, JENOPTIK, Jena, Deutschland) und der Software ProgRes®Capture 2.7.7 (JENOPTIK, Jena, Deutschland) erstellt. Neusynthetisierte Calciumkarbonat-Polymorphe wurden von Schalenschnitten je Zeitpunkt mit einem Rasterelektronenmikroskop (SEM, Leo 1530, Oxford Instruments, Oxford, UK) näher analysiert. Um eine bessere Auflösung zu erzielen, wurden die einzelnen Schnitte nicht mittels Sputterverfahren beschichtet. Die Bestimmung der synthetisierten Polymorphe wurde anhand von Raman-Spektroskopie verifiziert. Raman-Spektren wurden bei Raumtemperatur mit einem Horiba Jobin Yvon LabRAM HR Spektrometer (Lastek Photonics Technology Solutions, Thebarton, Australien), einem Si-basiertem CCD-Detektor (Peltier-gekühlt) und einem integrierten optischen Mikroskop (Olympus BX41, Hamburg, Deutschland) erstellt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Zu Beginn dieser Studie musste zunächst ein geeignetes Protokoll zur Isolierung von RNA aus *M. edulis* etabliert werden. Hierfür wurden Protokolle basierend auf Phenol-Chloroform-Extraktion (peqGold TriFast, peqlab, Erlangen, Deutschland; TRIzol, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) sowie RNA-Extraktion mit QIAshredder-Säulen und dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) getestet. Photometrische Bestimmungen der RNA-Konzentration, sowie elektrophoretische Auftrennungen der RNA mittels QIAxcel (Qiagen, Hilden, Deutschland) und Bioanalyzer (Agilent Technologies, Böblingen,

Deutschland) erbrachten, dass die qualitativ hochwertigste RNA mittels QIAshredder-Säulen in Kombination mit dem RNeasy Kit extrahiert werden konnte. Interessanterweise konnte nach keinen der getesteten Extraktionsprotokollen mittels elektrophoretischer Auftrennung 28S rRNA-Banden dargestellt werden. Quantitative *Real-time*-Analysen von 28S rRNA bestätigten jedoch die Anwesenheit dieser RNA im Extrakt. Das sehr frühe Signal und die mangelnde Effizienz der *Real-time*-PCR deuten auf einen entsprechend großen Anteil der 28S rRNA in der Gesamt-RNA hin, so dass es fraglich bleibt, warum die RNA nicht in der Elektrophorese darstellbar ist. Abweichungen vom „klassischen“ Gesamt-RNA-Muster wurden allerdings schon häufiger bei verschiedenen Evertebraten beobachtet (pers. Kommunikation M. Lucassen). Im Folgenden wird das Protokoll geschildert, mit dem die RNA schlussendlich für die Experimente isoliert wurde.

Das zentrale Mantelgewebe und die pallialen/marginalen Mantelregionen wurden separat präpariert, in flüssigem Stickstoff gefroren und mit Mörser und Pistill homogenisiert. 30 mg der Homogenate wurden für jede einzelne RNA Extraktion mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach vorheriger Reinigung mit QIAshredder-Säulen eingesetzt. Die isolierte RNA wurde in RNase freiem Wasser (Publikation I) oder in 0,1 mM EDTA und 10 mM Tris (pH 8,0) (Publikation II) gelöst. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (NanoDrop ND-1000, SeqLab, Erlangen, Deutschland) und ihre Reinheit über die Verhältnisse von 260/280 nm und 260/230 nm ermittelt.

2.5.2 Erstellung der cDNA-Bibliothek

Die cDNA-Bibliothek wurde aus Proben von zentralem und pallialem/marginalem Mantel aus der Langzeitinkubation von 8 Wochen erstellt. Gewählt wurden hierfür ausschließlich Gewebe von Muscheln, die unter 500 μ atm (Kontrolle) und 3700 μ atm gehältert wurden. Pro Gewebe und Inkubation wurden 8-12 RNA-Proben gepoolt und für die mRNA-Reinigung mit dem Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) eingesetzt.

Die cDNA Synthese erfolgte mit dem BD SMARTTM PCR cDNA Synthese Kit (BD Biosciene Clontech, Heidelberg, Deutschland). Für die Synthese des ersten Stranges wurden 380-560 ng der mRNA als Template zusammen mit 2 mM DTT und 0,8 mM dNTP für die SuperScript[®] II Reverse Transkriptase (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Der zweite Strang wurde mit dem Advantage[®] 2 PCR Enzyme System (BD Biosciene Clontech, Heidelberg, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers synthetisiert. Die Amplifikation erfolgte mit einem Zyklus von 1 min bei 95°C, 13 x (15 sec bei 95°C, 30 sec bei 65°C und 6 min bei 68°C).

Im Anschluss daran wurden die PCR-Produkte mit dem QIA-quick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt. Die Konzentration der generierten cDNA wurde photometrisch und zusätzlich mittels elektrophoretischer Auftrennung im Agarose-Gel bestimmt.

3-5 µg der doppelsträngigen cDNA wurden für die Pyrosequenzierung mit dem Genome Sequencer FLX System (454 Life Science, Branford, CT, USA) verwendet. Die EST-Assemblierung und die Durchführung der Annotation sind an anderer Stelle beschrieben (Philipp et al. 2012) und waren nicht Gegenstand dieser Arbeit. Die Gensequenzen, die für die Genexpressionsstudien (Publikation I und II) verwendet wurden, sind als Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) im European Nucleotide Archive (ENA) des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) mit der Study Accession Nummer ERP000937 und der Submission Accession Nummer ERA061781 hinterlegt. Die EMBL Accession Nummern einzelner Gene sind in Tab. 1 von Publikation II erfasst. Über diese Gene hinausgehende Sequenzen aus Publikation I wurden noch nicht bei EMBL eingereicht.

2.5.3 Quantitative *Real-time*-PCR

Zur Quantifizierung von Genexpressionsänderungen wurden Transkripte mittels quantitativer *Real-time*-PCR vervielfältigt (Publikation I und II). Hierfür wurden zunächst 3 µg der Gesamt-RNA je Probe mit dem TURBO DNA-free Kit (Ambion, Darmstadt, Deutschland) von DNA-Kontaminationen befreit. Die Synthese von cDNA erfolgte aus 0,4 µg der DNA-freien RNA mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Primersequenzen wurden mit der Primer Express® Software für *Real-time*-PCR (Version 3.0, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) erstellt. Die Amplifikation erfolgte mit dem StepOnePlus *Real-time* PCR System (System Version 2.2.3, StepOne Software Version 2.0) mit Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) (Publikation I) oder mit dem 7500 *Real-time* PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) und SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) (Publikation II). Die Effizienzen der Primer und PCR-Reaktionen wurde anhand von Verdünnungsreihen mit cDNA-Konzentrationen von 0,04 µg-2 ng bestimmt. Abhängig von der Effizienz der Amplifikationen wurden Primer in einer Konzentration von 300 oder 900 nM gewählt, bedingt durch das zu quantifizierenden Gen variierten die eingesetzten cDNA-Konzentrationen zwischen 2 ng, 0,2 ng oder 0,02 ng. Unterschiede in der Genexpression wurden anhand der ddC_T-Methode ermittelt. Die Expressionen wurden jeweils mit 18S rRNA normalisiert und Genexpressionsänderungen als log₂ fold-changes im Verhältnis zu Kontrollwerten angegeben.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Herstellung von Proteinextrakten

Für die Herstellung von Proteinextrakten wurden Kiemengewebe und palliale/marginale Mäntel von Langzeit-inkubierten *M. edulis* (1 Jahr, 600, 1300, 2400 und 4200 µatm) präpariert. Zunächst wurden die entnommenen Gewebestücke in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei

-80°C gelagert. Zur Homogenisierung wurden Gewebeprobe von drei willkürlich gewählten Tieren je Inkubationsbecken vereinigt, sodass zwei Pools pro Becken und insgesamt acht Replikate pro Behandlung erstellt wurden.

Zuerst wurden die Gewebe in Homogenisierungs-Puffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1% ASB-14, 40 mM Tris, 0,001% Bromphenolblau, 40 mM DTT) mit 0,5% immobilisiertem pH-Gradienten-Puffer (IPG-Puffer, pH 4-7, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) im Verhältnis von 1:4 (Gewebe [mg]:Puffer [µl]) homogenisiert. Anschließend wurden die Suspensionen bei Raumtemperatur für 30 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Die Proteine des Überstands wurden über Nacht bei -20°C mit 10% Trichloressigsäure in Aceton im Verhältnis von 1:4 (Homogenat [µl]:TCA/Aceton [µl]) präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 4°C für 15 min und 18.000 x g wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit eiskaltem 100%igem Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C wurde das Acton verworfen und das Pellet in Puffer aus 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2% CHAPS, 2% NP-40, 0,002% Bromphenolblau, 0,5% Ampholyte, 100 mM DTE und 0,5% IPG-Puffer (pH 4-7, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) rehydriert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei Raumtemperatur für 10 min und 16.000 x g aus dem Extrakt entfernt. Die Proteinkonzentration wurde mit dem 2D Quant Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) nach Anweisungen des Herstellers bestimmt.

2.6.2 Zwei-dimensionale Gel-Elektrophorese

Zur Separation der Proteine entsprechend ihrer isoelektrischen Punkte wurden 400 µg Protein pro IPG-Streifen (pH 4-7, 11 cm, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) geladen. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte in einer PROTEAN® IEF Zelle (BioRad, Hercules, CA, USA) mit folgenden Schritten: passive Rehydrierung für 5 h, aktive Rehydrierung für 12 h bei 50 V, Lauf für 1 h bei 500 V, 1 h bei 1000 V und 5 h bei 8000 V. Im Anschluss an die Fokussierung wurden die IPG-Streifen für mindestens 30 min bei -80°C eingefroren und danach in 375 mM Tris, 6 M Harnstoff, 30% Glycerin, 2% SDS, 0,0002% Bromphenolblau für 15 min, zunächst unter Zugabe von 65 mM DTT, dann von 135 mM Iodacetamid, äquilibriert.

Für die Auftrennung anhand des spezifischen Molekulargewichts der Proteine wurden zunächst die äquilibrierten IPG-Streifen sowie ein Proteinstandard (BioRad, Hercules, CA, USA) horizontal auf der Oberfläche eines 12%igen Polyacrylamid-Gels mit 0,8%iger Agarose (gelöst in Lauf-Puffer aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0.1% SDS) verschlossen. Die Separation der Proteine erfolgte für 55 min bei 200 V in einer Criterion Dodeca Zelle (BioRad, Hercules, CA, USA) in Lauf-Puffer. Die SDS-Gele wurden über Nacht mit Coomassie Brilliantblau G-250 (BioRad, Hercules, CA, USA) gefärbt, in MilliQ-Wasser (Millipore, Billerica, MA, USA) entfärbt und anschließend gescannt (Model 1280, Epson, Long Beach, CA, USA).

2.6.3 Gel-Bild-Analyse

Für jede Treatment-Gruppe und Gewebe wurden 8 Gele (von je 3 Proben) erstellt. Die dazugehörigen Gel-Bilder wurden mit der Delta2D Software (Version 4.1, Decodon, Greifswald, Deutschland) analysiert. Um die Gele vergleichen zu können und um konsistente Protein-Spots zu erhalten, wurden Gele zunächst innerhalb der Behandlungsgruppen und anschließend zwischen den einzelnen Gruppen durch selbst erstellte Match-Vektoren angeglichen. Ein Fusionsbild mit durchschnittlichen Spot-Abundanzen wurde benutzt um Protein-Spot-Abgrenzungen zu detektieren, die wiederum auf jedes einzelne Gel übertragen wurden. Unterschiede in Proteinmengen pro Spot und Treatment-Gruppe wurden durch eine One-Way-Permutations-ANOVA ermittelt. Anschließend wurde die Gesamtheit der mutmaßlich geänderten Proteine auf Korrektheit der Detektion überprüft, sodass offensichtlich unkorrekt detektierte Spots aus weiteren Analysen ausgeschlossen werden konnten.

2.6.4 Massenspektrometrie

Signifikant geänderte Protein-Spots wurden aus den Gelen ausgeschnitten und für massenspektrometrische Analysen vorbereitet. Dazu wurden die Gelstückchen zwei Mal mit 25 mM Ammoniumbicarbonat in 50% Acetonitril entfärbt und in 100% Acetonitril getrocknet, bevor die Proteine über Nacht bei 37°C mit Trypsin verdaut wurden (Promega, Madison, WI, USA; 11 ng/μl in 40 mM Ammoniumbicarbonat gelöst in 10% Acetonitril). Am nächsten Tag wurde der Überstand entfernt und verwahrt. Die Gelstückchen wurden zwei Mal in 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in Acetonitril (2:1) gewaschen, um restliche Peptide zu extrahieren. Anschließend wurden die Peptide aller Überstände mit einer SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bis zur Trocknung aufkonzentriert. Die getrockneten Peptide wurden in 0,2 mg/ml α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure (HCCA) in 0,1% TFA:Acetonitril (1:20) gelöst und auf eine Anchorchip™ Target Platte (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA) aufgetragen. Die gespotteten Peptide wurden mit 10 mM Ammoniumphosphat in 0,1% TFA gewaschen und mit Ethanol, Aceton und 0,1% TFA (6:3:1) rekristallisiert.

Peptide Mass Fingerprints (PMFs) wurden mit einem matrixunterstütztem Laser-Desorptions/Ionisations-Tandem-Flugzeit-Massenspektrometer (MALDI-ToF-ToF, Ultraflex II, Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA) erhalten. Hierbei wurde ein Minimum von 12 Peptiden mit einer Ladung von +1 gewählt, um ausreichend Informationen über die b- und y-Ionen der Peptidsequenzen zu erhalten.

Die Software FlexAnalysis (Version 3.4, Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA) diente der Analyse der Spektren und der Kalibrierung der Massen-Spektren mit Trypsin aus Schwein. Mit dem HopHat-Algorithmus wurde die Basislinie subtrahiert, die Savitzky-Golay-Analyse wurde zum Glätten der Daten angewendet (0,2 m/z; Zyklenanzahl = 1), und der SNAP-Algorithmus diente der Detektion von Peaks (Signal-zu-Rausch-Verhältnis: 6 für MS und 1,5

für MS/MS). Zwei Datenbanken wurden innerhalb des Mascot Servers (Version 2.2, Matrix Science Inc., Boston, MA, USA) geladen, um Proteinidentifikationen zu ermöglichen. Für die Identifizierung von Proteinen wurden PMF- und MS/MS-Daten kombiniert. Zunächst wurde innerhalb der *Mytilus edulis* cDNA-Bibliothek (Reads sind im Sequence Read Archive (SRA) des European Nucleotide Archive (EMBL) hinterlegt, Study Accession Nummer ERP000937, Submission Accession Nummer ERA061781) nach Ähnlichkeiten gesucht bevor eine Suche in der Proteindatenbank bei NCBI für Metazoa erfolgte. Als mögliche Modifikationen wurden Oxidationen von Methionin und Carbamidomethylierungen von Cystein eingeschlossen. Die Sucheigenschaften erlaubten eine fehlende Spaltung während des Trypsinverdaus. Für Tandem-Massenspektrometrie wurde eine Vorläufer-Ionen-Massen-Toleranz von 0,6 kDa gewählt. Der MOWSE-Score, der signifikante Hits kennzeichnet, betrug bei der *M. edulis* Datenbank 41 ($p < 0,05$) und bei der Suche in der Metazoa-Datenbank 45. Positive Identifikationen wurden nur dann akzeptiert, wenn zusätzlich zum MOWSE-Score oberhalb des Signifikanz-Levels ein Minimum von zwei Peptiden gegeben war.

2.7 Statistische Auswertung

Zur Bestimmung von signifikanten Änderungen in Genexpressionen, Proteinabundanz und Schalenwachstumsraten wurden verschiedene Varianzanalysen, wie One-Way-ANOVA, Two-Way-ANOVA (SigmaStat, Version 3.5, Systat Software, Erkrath, Deutschland) und ANOVA mittels Permutation (Delta2D Software, Version 4.1, Decodon, Greifswald, Deutschland) mit nachfolgendem post-hoc Test (Student-Newman-Keuls, SigmaStat, Version 3.5, Systat Software, Erkrath, Deutschland) durchgeführt. Als Signifikanz-Level wurde jeweils $\alpha = 0,05$ gewählt. Änderungen in Sauerstoffverbrauch, Ammoniumexkretionsraten, Filtrationsleistungen und Wachstumsvermögen wurden mittels Regressionsanalysen in SigmaPlot (Version 9 Systat Software, Erkrath, Deutschland) überprüft. Graphen wurden in SigmaPlot erstellt und beschreiben Mittelwerte mit Standardabweichungen oder Standardfehlern, oder illustrieren die Verteilungen von Einzelwerten. Korrelationsnetzwerke wurden mittels paarweiser Korrelation nach Spearman berechnet und in R (R Development Core Team 2011) gezeichnet. Non-metric multi-dimensional scaling (nMDS, Bray-Curtis) und One-Way Analysis Of Similarity (ANOSIM) der proteomischen Daten wurden mit Primer 6 (Version 6.1.6, PRIMER-E Ltd., Plymouth, UK) erstellt. *R*-Werte der ANOSIM wurden entsprechend Clarke und Gorley (2001) interpretiert: $R < 0,25$ (gleich), $R > 0,5$ (teilweise überlappend) und $R > 0,75$ (verschieden).

3 Publikationen

Liste der bereits veröffentlichten oder beabsichtigten Publikationen und Erklärungen über den von mir geleisteten Anteil:

Publikation I

Anne K. Hüning, Skadi M. Lange, Dorrit E. Jacob, Daniel Jackson, Ulrike Panknin, Magdalena A. Gutowska, Eva E. R. Philipp, Philip Rosenstiel, Magnus Lucassen, Frank Melzner (in Bearbeitung). **Functional tissue plasticity as a response to initiated shell repair in the blue mussel *Mytilus edulis*.**

Ich habe zusammen mit FM und SML das Konzept der Studie erstellt. Ich habe die Muscheln angebohrt und die Inkubationen betreut. Die Präparation der Muscheln erfolgte zusammen mit UP. Die Genexpressionsdaten, die UP nach meinen Anleitungen erhoben hat, habe ich ausgewertet und zusammen mit SML und FM die erste Version des Manuskripts erstellt.

Publikation II

Anne K. Hüning, Frank Melzner, Jörn Thomsen, Magdalena A. Gutowska, Lars Krämer, Stephan Frickenhaus, Philip Rosenstiel, Hans-Otto Pörtner, Eva E. R. Philipp, Magnus Lucassen (2013). **Impacts of seawater acidification on mantle gene expression patterns of the Baltic Sea blue mussel: implications for shell formation and energy metabolism.**

Das Konzept des Versuchs habe ich zusammen mit FM und ML entwickelt. Die Probenvorbereitungen und die Messungen der Genexpressionen, sowie deren Auswertungen, wurden von mir durchgeführt. Die Erstellung der Korrelationsnetzwerke erfolgte zusammen mit SF. Ich habe das primäre Manuskript erstellt, welches zusammen mit meinen Ko-Autoren überarbeitet wurde.

Publikation III

Anne K. Hüning, Jörn Thomsen, Marcus J. Zuzow, Julia Saphörster, Ulrike Findeisen, Hans-Otto Pörtner, Magnus Lucassen, Lars Tomanek, Frank Melzner (eingereicht). **Long-term acclimation to elevated P_{CO_2} in the blue mussel *Mytilus edulis*: energy budgets and tissue-specific proteomics.**

Ich habe zusammen mit LT, FM und ML das Konzept der proteomischen Teilstudie erstellt. Die Durchführung und Auswertung des proteomischen Teils erfolgte durch mich, die Identifizierung der Proteine erfolgte zusammen mit MJZ. Ich habe die erste Version des Manuskripts zusammen mit LT und FM verfasst. Zusammen mit den Ko-Autoren wurde diese überarbeitet.

Publikation I

Functional tissue plasticity as a response to initiated shell repair in the blue mussel *Mytilus edulis*

Anne K. Hüning, Skadi M. Lange, Dorrit E. Jacob, Daniel Jackson, Ulrike Panknin, Magdalena A. Gutowska, Eva E. R. Philipp, Philip Rosenstiel, Magnus Lucassen, Frank Melzner

in Bearbeitung

Functional tissue plasticity as a response to initiated shell repair in the blue mussel *Mytilus edulis*

Anne K. Hüning^{1*}, Skadi M. Lange^{2*}, Dorrit E. Jacob³, Daniel Jackson⁴, Ulrike Panknin², Magdalena A. Gutowska², Eva E. R. Philipp⁵, Philip Rosenstiel⁵, Magnus Lucassen¹, Frank Melzner²

¹Alfred Wegener Institute, Helmholtz Centre for Polar and Marine Research, Bremerhaven, Germany

²GEOMAR Helmholtz Centre for Ocean Research Kiel, Kiel, Germany

³Macquarie University, Sydney, Australia

⁴Georg-August Universität, Göttingen, Germany

⁵Christian-Albrechts Universität, Kiel, Germany

* both authors contributed equally

Corresponding author: Frank Melzner
Address: Hohenbergstr. 2
D-24105 Kiel
Germany
Email: fmelzner@geomar.de
Telephone: +49(431)600-4274

Abstract

The bivalve shell represents an ideal model for investigating mollusc biomineralization. Multiple experiments were conducted to elucidate the processes underlying shell matrix synthesis and subsequent calcium carbonate polymorph formation, and shell-repair assays have proven to be an appropriate tool to shed light on the successive biomineralization stages. However, existing studies have either focussed on newly built shell parts, structural modification in the epithelial cells of the mantle, gene expression alterations or on protein functioning, the latter mainly based on *in vitro* assays.

Here we provide (1) an analysis of specifically expressed sequences from mantle transcriptome of the blue mussel *M. edulis* and (2) an integrative approach on the shell-repair process in the blue mussel combining an analysis of the newly synthesized shell material by stereo microscopy, SEM and Raman spectroscopy with the investigation of repair-induced alterations or inductions of expression of 10 genes via quantitative real-time PCR. Following a drilling procedure on central shell parts, mussels were suspended in Kiel Fjord for 20, 29 and 36 days. Structural observation revealed organic matrix synthesis during the first step of shell-repair followed by the formation of (i) calcite crystals and (ii) aragonite tablets. The regeneration period was markedly characterized by time-dependent shifts in gene expression: 1. increased expression of two tyrosinase isoforms (TYR3: 29-fold and TYR6: 5-fold) in the inner mantle of the damaged site at day 20 with a decline over time, 2. an increase in expression of a gene coding for a nacrein-like protein (max. 100-fold) from day 29 on in the inner mantle of the treated site. The expression of p4338 was enhanced in the inner mantle tissue of the treated site during the entire regeneration process (max. 6-fold on day 29). The expression of genes coding for a carbonic anhydrase, a calponin-like protein and a chitin synthase was not changed in the central mantle during shell-repair.

This study proves tissue-related shifts in expression of four out of 10 tested genes during the mineralization process. As a response to shell damage, expression of candidate genes normally restricted to the outer mantle was specifically up-regulated in inner mantle tissues close to the site of repair and intimately linked to the structural development. Our results give percussive evidence of functional plasticity in *M. edulis* mantle tissues and adjustment of gene expression as an answer to regeneration-specific demands.

Introduction

Biomineralization is one of the most fascinating processes in the animal kingdom. Mineral skeletons made of silica and calcium carbonate (CaCO_3) can be traced back until the terminal Proterozoic (Knoll 2003). Since the Proterozoic-Cambrian transition, the mollusc phylum experienced a broad evolutionary success that can partly be attributed to their ability of building protective shell constructions, consisting of species-specific patterns of CaCO_3

polymorphs. The mytilid mollusc shell comprises two CaCO_3 polymorphs with the inner shell layer (nacre, mother-of-pearl) being composed of tabloid aragonitic crystals, the outer layer of calcitic prisms (Uozumi and Suzuki, 1979; Marin et al., 2007). It is externally covered by the periostracum, a protective organic layer of varying thickness on μm scale (Harper, 1997), with species-specific alterations (de Paula and Silveira, 2009). The tissue responsible for biomineralization is the mantle, situated underneath the shell. Three mantle zones have been identified to be protagonists in CaCO_3 polymorph formation: While the outer mantle (marginal and pallial zone) is involved in calcite and aragonite formation, the inner mantle (central zone) is responsible for formation of the aragonitic shell-layer, primarily during secondary growth in shell thickness (Owen et al., 1953; Kadar et al., 2009). The periostracum evolves from the inner epithelial cells of the outer mantle fold (Beedham 1958). It is built from periostracin, a DOPA-containing precursor-protein (Waite et al. 1979) that undergoes a tanning process during which DOPA is oxidized by tyrosinases to quinones (Waite 1983), a reaction followed by subsequent cross-linking of the quinones to nucleophilic groups (Waite and Andersen 1980).

Shell-formation involves the secretive introduction of an organic matrix framework comprising proteins and polysaccharides (e.g. silk-fibroin and β -chitin) (Weiner and Traub, 1980; Lowenstam and Weiner 1989, Levi-Kalishman et al. 2001, Addadi et al., 2006). Polymorph formation depends on specific interactions with the framework of constituents (Lowenstam and Weiner, 1989; Addadi and Weiner, 1985; Levi-Kalishman et al., 2001; Zhang et al., 2006). *In vitro* studies confirmed that aspartic acid-rich shell matrix proteins specifically regulate and induce biomineralization (Addadi and Weiner, 1985; Gotliv et al., 2003), and these proteins could be identified in the prismatic layer of *Atrina rigida* (Gotliv et al., 2005). It has furthermore been demonstrated that aspartic acid-rich hydrophilic macromolecules, extracted from calcitic or aragonitic shell-layers, respectively, determine the formation of CaCO_3 polymorphs *in vitro* (Falini et al., 1996), provided that a microenvironment of β -chitin and silk fibroin was present (Levi et al., 1998). The detection of an insoluble, acidic matrix protein (Pif), in the pearl oyster *Pinctada fucata* (Suzuki et al., 2009) altered the existing hypotheses for aragonite formation. Pif apparently contains a chitin-binding domain as well as an aragonite-binding domain and regulates the aragonitic crystal orientation during growth (Suzuki et al., 2009). This observation suggested a new model for aragonite formation, in which a hydrophobic protein complex, together with the protein-bound chitin, provides the core of a three-dimensional nucleation site for aragonite (Weiss, 2010). The discovery of nacrein, a matrix protein isolated from the nacreous layer of *P. fucata*, which possesses a Gly-X-Asn repeat domain and a carbonic anhydrase domain, led to contradicting hypotheses about its function in either propagation or inhibition of aragonite formation (Miyamoto et al., 1996, 2005). A recent study on *in vitro* mineralization processes in *P. fucata* led to the detection of a matrix protein that can act as a binding factor between organic matrices and evolving crystals (Liu et al.,

2011). It is evident from these studies and the numerous specific gene transcripts with unknown function that have been identified in various mollusc mantle transcriptomes (e.g. Jackson et al., 2010; Clark et al., 2010; Bai et al., 2010) that a complex and species specific mixture of carbohydrates and proteins are interacting with the calcium carbonate moiety of the shell. It is a great challenge to identify those unknown transcripts that are essential for shell formation. In the absence of functional RNA knockdown techniques for molluscs to study gene function (however, see Suzuki et al., 2009), we chose to use a shell regeneration assay to identify genes related to specific phases of the biomineralization process.

Within a natural environment, the bivalve shell is continuously exposed to biotic and abiotic stressors that can lead to shell fracture or injury, e.g. during boring activity (Owada, 2009), human dredging and digging activities (Vasconcelos et al., 2011; Ambrose et al., 1998) or via iceberg scours (Harper et al., 2012). Mytilid mussels e.g. from the North Sea are often heavily infested by the shell boring spionid worm *Polydora ciliata* (Ambariyanto and Seed, 1991). To counteract shell injury, repair mechanisms have evolved as essential tools to prevent the organism from subsequent vulnerability to predation and to defend the extracellular compartment against microbial, protozoan or metazoan intruders. Repair processes in bivalve molluscs have been studied in a number of species and common mechanisms have been identified: analogous to the normal biomineralization process, a periostracum-like layer is formed to seal the damaged shell area from the outside medium, followed by calcite secretion onto the organic layer, and, finally, aragonite formation. Circumstantial evidence points at the involvement of the underlying epithelial cells in repairing the injured shell region: histological studies indicated strong changes in cell morphology (e.g. mitochondrial proliferation, modifications in cell size and microvilli abundance, cytoplasm appearance, calcium positive deposits) and histochemical studies demonstrated e.g. modifications in RNA and alkaline phosphatase abundance (Kawaguti and Ikemoto, 1962; Beedham, 1965; Uozumi and Suzuki, 1979; Kadar et al., 2009; Tsujii, 1976; Saleuddin, 1967). Thus, it appears that mantle regions that are normally not secreting specific shell constituents can be induced to do so. We therefore hypothesized that by inducing shell injury, gene expression patterns in central mantle tissue should be evoked that resemble characteristic expression patterns for the mantle margin region, the main area of biomineralization. One existing study already demonstrated an up-regulation of numerous genes related to shell formation in mantle tissue of the Pacific oyster after shell damage (Wang et al., 2013). However, these changes in gene expression were not correlated to different shell repair stages.

In our study, we thus combined a structural approach, using stereo microscopy, SEM and Raman spectroscopy to ‘phenotype’ the shell regenerate following induced injury of shell overlying the central mantle while studying gene expression patterns in the underlying tissue. We used quantitative real-time PCR to study the expression of a subset of candidate genes that

were highly or specifically expressed in mantle margin regions during normal biomineralization or lower expressed transcripts that are suggested to be involved in shell formation. Candidate genes were derived using transcriptomes of different mussel tissues (Philipp et al., 2012). Our hypotheses were that (i) as a response to shell damage, expression of candidate genes mainly expressed in outer mantle tissue could be induced in central mantle parts (e.g. close to the site of damage), and that (ii) the phenotypic appearance of shells would reflect the underlying gene expression patterns through time.

Materials and Methods

Animals and experimental design

Mytilus edulis individuals with a mean shell length of 49 ± 2 mm were collected at three time points (04/07/11, 04/11/11 and 04/12/11; min. 15 mussels each) in Kiel Fjord (54°19.8'N, 10°9.0'E). Nine holes were evenly drilled per animal into the centre of the left valve (see Fig. 2) using a multifunctional drill (N 62/E, Proxxon, Niersbach, Germany) with a drilling head of 1 mm diameter. The site of drilling was centred directly above the central mantle tissue in an orthogonal 3 x 3 design. Mussels were suspended in net cages (mesh width of 15 mm) in Kiel Fjord at depths of 2 m. The experiment lasted for 41 days and 6 animals were sampled on days 20, 29 and 36. The net cages were checked three times a week, and fouling organisms were removed in order to enable maximum water flow and plankton supply to the experimental animals.

Water chemistry parameters

Salinity (WTW Cond 315i, WTW GmbH, Weilheim, Germany), surface water temperature (WTW Cond 315i, WTW GmbH, Weilheim, Germany) and pH_{NBS} (WTW pH 340i, WTW GmbH, Weilheim, Germany) were measured 1-5 times a week during the entire experimental time (see Fig. 1).

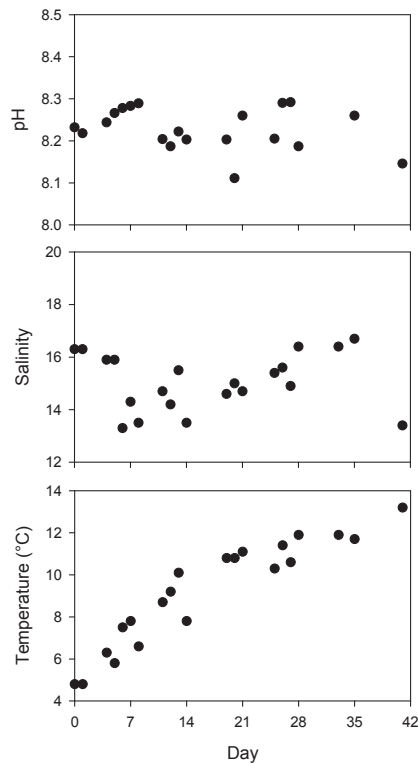


Fig. 1: Surface pH, salinity and water temperature (Kiel Fjord) measured during the experimental period.

Structural shell analysis

Shell regeneration states were assessed by classifying shells according to four repair stages (Tab. 1). At the first stage (stage I), no signs of repair were detectable. The following stages were characterized by initial formation of an organic sheet (stage II), enhancement of sheet rigidity and formation of scattered calcite crystals on the organic layer (stage III) and formation of calcite and aragonite crystals on the sheet (stage IV). For each stage and point of time, one photograph of a representative inner shell layer was chosen for the illustration of the shell regeneration progress. Detailed images of the inner shell regions were taken under a stereo microscope (Wild Heerbrugg, magnification 6-50 x), using JENOPTIK ProgRes®Capture 2.2 (JENOPTIK, Jena, Germany). For further structural analysis of the polymorphs, scanning electron microscopy (SEM, Leo 1530, Oxford Instruments, Oxford, UK) was applied to multiple sections of one shell per point of time, respectively. To allow for better resolution of mineralized structures, shell sections were not sputter coated. Optical determination of the polymorphs was supported using Raman spectroscopy. Raman spectra were recorded at room temperature using a Horiba Jobin Yvon LabRAM HR spectrometer equipped with a Si-based CCD-detector (Peltier-cooled) and an integrated Olympus BX41 optical microscope. SEM pictures and Raman spectra were chosen exemplary for the stages observed during the repair process.

Tab. 1: Repair stages according to the observed repair-progress

Stage	Description
I	No visible components of shell-repair process
II	Organic matter formation (light brown)
III	Organic matter shaded & rigid, CaCO ₃ visible (calcitic)
IV	Organic matter shaded & rigid, CaCO ₃ visible (calcitic, aragonitic)

Mantle tissue transcriptome and choice of candidate genes

A *M. edulis* transcriptome was generated using multiple tissues from Kiel Fjord blue mussels subjected to a variety of biotic and abiotic stresses (Philipp et al., 2012). Mantle transcriptomes were sequenced using fast growing mussels cultured under optimum food supply for 8 weeks in the laboratory (control group from Thomsen and Melzner, 2010). Separate mantle transcriptomes were generated for the central mantle part (inner mantle) and the pallial and marginal zone (outer mantle) using pooled total RNA (inner mantle: 12 samples; outer mantle 11 samples). RNA extraction, sequencing, assembly and annotation of the transcriptomes have been described elsewhere (Philipp et al., 2012). In order to identify genes potentially related to the biomineralization process, our *M. edulis* transcriptome was screened according to the following procedure: a list was created that contained all expressed genes that were (i) at least expressed >100 sequenced reads per million sequenced in the mantle marginal and pallial zones (outer mantle), (ii) at least 10-fold higher expressed in the outer mantle than in a mixed transcriptome generated from a tissue mix containing digestive gland, adductor muscle, gill and foot (Philipp et al., 2012). This resulted in a list of 327 sequences. These sequences were translated using the BioPerl script longorf.pl (<http://www.bioperl.org/wiki/BioPerl>) and further screened for signal peptides (signalP, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) and amino acid composition using Microsoft Excel. Several genes from the list of 327 sequences were chosen for quantitative real-time PCR analysis in this study (i.e. CHS, p4338, CPEROX, NACR, TYR2, TYR3, TYR6). The chosen transcripts were coding for four tyrosinase isoforms (TYR1, TYR2, TYR3, TYR6), a nacrein-like protein (NACR), a chorion peroxidase (CPEROX), a carbonic anhydrase (CA), a chitin synthase (CHS), a calponin-like protein (CNN), and an unknown protein (p4338) (Tab. 2).

Tab. 2: Number of reads per million sequenced reads per contig of inner (IM) and outer (MR) mantle tissue deduced from the mantle transcriptome used for gene expression determination. Sequences already used for a previous gene expression study (Hüning et al., 2013) are denoted with their respective EMBL accession numbers.

Gene	Name	Contig No.	EMBL accession No.	Read per million (IM)	Reads per million (MR)
18S	18S ribosomal RNA	53141	HE662843	289	255
CA	carbonic anhydrase	72322		0	952
CHS	chitin synthase	64848	HE662847	35	181
CNN	calponin-like protein	5049	HE662833	139	1307
CPEROX	chorion peroxidase	58942	HE662846	0	831
NACR	nacrein-like protein	39557	HE662840	0	1267
p4338	--	4338	HE662831	330	3398
TYR1	tyrosinase	2527	HE662821	41	13
TYR2	tyrosinase	3233	HE662825	0	4691
TYR3	tyrosinase	12338		6	462
TYR6	tyrosinase	34154		0	1441

Isolation of total RNA

Central and outer mantle tissue from each mussel side was dissected separately on ice, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until usage. Total RNA was extracted from 30 mg of tissue using QIAshredder columns and the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. RNA concentration was estimated photometrically at 260 nm (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany). Purity of RNA was assessed by measurement of ratios of 260 nm/280 nm and 260 nm/230nm.

Quantitative real-time PCR

3 µg of total RNA was digested with the TURBO DNA-free kit (Ambion, Darmstadt, Germany). Out of 0.4 µg of DNA free RNA cDNA was synthesised using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Primer-pairs (Tab. 3) were constructed using the Primer Express® Software for Real-time PCR (version 3.0, Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) with the TaqMan MGB Quantification method under default settings. PCR fragments were amplified with the StepOnePlus Real-Time PCR System (System version 2.2.3, StepOne Software version 2.0) using Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany).

Tab. 3: Primer data for the genes used for the gene expression study including primer name, gene/protein description, primer sequence, efficiency, accession number and organism of appropriate BLAST match.

Primer name	Gene/Protein description	Primer Sequence	Efficiency	Accession No. (Organism)
18S_for 18S_rev	18S ribosomal RNA	CCGGCGACGTATCTTTCAA AGGCATATCACGTACCATCGAA	1.99	AY527062.1 (<i>Mytilus edulis</i>)
CA_for CA_rev	carbonic anhydrase	CGGGATCGGAAGATCTTGTC CAACCCGGCAGTTAATTGGT	1.95	EKC33179.1 (<i>Crassostrea gigas</i>)
CHS_for CHS_rev	chitin synthase	CAAAGACGTCGATGGTCTCCTT CGCCATGAAGCTAACAAATCC	1.99	ABQ08059.1 (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)
CNN_for CNN_rev	calponin-like protein	AGCCCTGATATCGGCTATGTGT GATTTCGCTAGCCAAAAGGGAAT	2.12	AB052656.1 (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)
CPEROX_for CPEROX_rev	chorion peroxidase	GATCAGAATCAGCGCCTTACAA CGATGTGGCCTGGTTCATCT	1.98	EKC41685.1 (<i>Crassostrea gigas</i>)
NACR_for NACR_rev	nacrein-like protein	ACAACAATTTATGTGAAGGACCAGAT CGCAGGTCGTCCAACATG	1.93	P86856.1 (<i>Mytilus californianus</i>)
p4338_for p4338_rev	--	TCAGTTCGAGAGTTCTGATGGT AGCTACTAGAACTCTGTCCACCGTGTA	2.00	-- --
TYR1_for TYR1_rev	tyrosinase	GCCCCACCCTGATGCAT AAGTCGGTCTACCCAACAAA	2.11	EKC23361.1 (<i>Crassostrea gigas</i>)
TYR2_for TYR2_rev	tyrosinase	CCCTTCTGGCCAGTTTGTGAC AAGGCAGCAAGTAAAAGCTGGTA	1.95	EKC18549.1 (<i>Crassostrea gigas</i>)
TYR3_for TYR3_rev	tyrosinase	TCTGTACCGACGTTTCTACGAAGA AACAGGACCGTTTGCAGGAT	2.01	EKC32242.1 (<i>Crassostrea gigas</i>)
TYR6_for TYR6_rev	tyrosinase	ACGGAATTGCGGTAGCTAGTG AAGTAAAGTCGGTGCCATGGTAA	1.97	EKC18548.1 (<i>Crassostrea gigas</i>)

By using different template concentrations ranging from 0.04 to 2 ng amplification efficiencies per gene were calculated with $10^{(-1/\text{slope})}$. Values ranged between 1.93 and 2.12, respectively. 0.02 ng of template cDNA was used for amplification of 18S, 2 ng for all other genes. CA was amplified with 900 nM of each primer, all other genes with 300 nM. Dissociation curves approved the generation of specific PCR products per assay.

Relative gene expression changes were calculated using the ddC_T-method with 18S rRNA as endogenous control. We chose 18S as housekeeper, as this gene was the most constantly expressed in both tissues in our dataset and was previously shown to be an appropriate housekeeper in *M. edulis* (Hüning et al., 2013). Log₂ fold-changes were calculated in comparison to the outer right mantle tissue (20d), which was not been subjected to the drilling treatment and served thus as internal control for quantitative real-time PCR.

Statistical Analysis

Significant changes in transcript abundances over time and between the two tissue sites (right vs. left) were determined on ddC_T values with a Two-Way-ANOVA for outer and inner mantle tissue followed by a post-hoc test (Student-Newman-Keuls, ($\alpha < 0.05$) using SigmaStat (version 3.5, Systat Software, Erkrath, Germany). The post-hoc test was only applied to normal distributed data and when equal variances were approved. To meet normal distribution of the data, expression values of NACR and TYR6 had to be transformed by ranks.

Results

Structural shell analysis

At day 20, stereo microscopic examination of the injured valves revealed a fragile, heterogeneous organic sheet with none (33%) to few mineral traces (67%) on the regenerate. This sheet was approx. 0.5 mm thick and had a periostracum-like appearance of light brown colour with insular dark brown spots and lines (Fig. 2A-C). SEM of the latter 67% revealed clusters of organic aggregations, from which first calcitic structures had developed. Therefore, valves were assigned to stage II and III, respectively (Tab. 4). In 50% of all experimental animals, one large organic patch was synthesized that covered all holes (Fig. 2A, C), whereas in the other half of the experimental animals, multiple organic patches were generated, some of which covered individual holes precisely (Fig. 2B, D). At day 29, all regenerates were characterized by irregular calcitic structures on the organic matrix sheets, with the majority of specimens having covered the large part of the damaged area. Consequently, they were assigned to stage III (Tab. 4, Fig. 2D, E). At day 36, aragonitic structures were detected in two of six valves. Apparently, mineralized structures in the other four specimens exclusively consisted of calcite. Again, extensive coverage of the organic matrix was observed for the majority of specimens, while calcification in one specimen had not progressed that far. Assignments to stage IV and III were done, respectively (Tab. 4, Fig. 2G, H). Raman spectroscopy undermined SEM observations, with CaCO_3 phases showing the typical Raman bands for calcite and aragonite (Fig. 2F, I).

Generally, observations of the treated valves showed high variation in the regeneration speed between individuals at day 20 and at day 29 and 36, with the latter two points of time being mainly differentiable through their polymorph composition.

Tab. 4: Percentage of specimens per repair stage and sampling date.

Sampling date	Percent specimens/repair stage			
	stage I	stage II	stage III	stage IV
20d	0	33	67	0
29d	0	0	100	0
36d	0	0	67	33

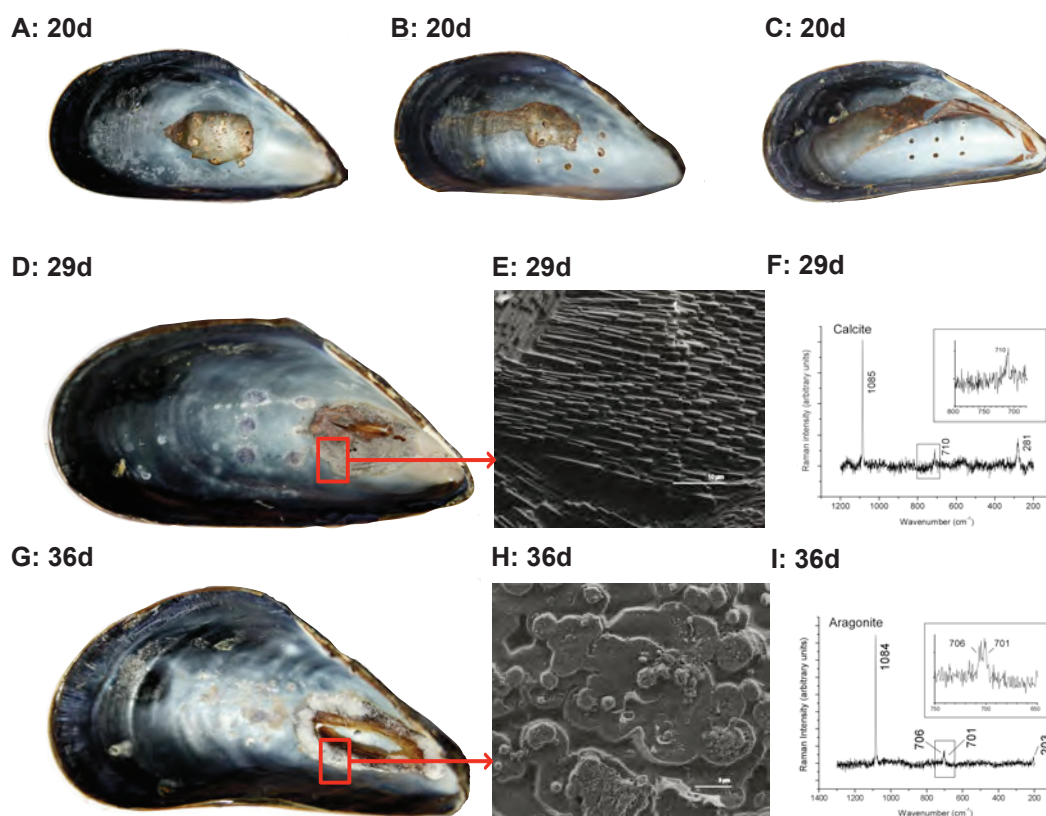


Fig. 2: Left valves of *M. edulis* specimens from all three sampling dates. A, B, C: After 20 days of shell repair when an organic sheet was synthesized to seal the organisms from the environment - note the individual progress and differences in sealing patterns. D: Exemplary valve for 29 days of shell repair when calcite formation had taken place, E: SEM picture of calcitic needles in analyzed shell parts, F: respective Raman spectrum with characteristic peaks for calcite. G: Exemplary valve for 36 days of shell repair with first traces of aragonite, H: SEM picture of tabloid aragonite in analyzed shell parts, I: respective Raman spectrum with characteristic peaks for aragonite.

Mantle transcriptome analysis

We identified 327 sequences within the outer mantle (marginal and pallial zone) transcriptome that were expressed at least at a frequency of >100 reads per million sequenced and at least 10 times higher than in the mixed tissue transcriptome (Tab. 5). 139 of these sequences (43%) could be annotated (Blastx, E-10). 155 of these 327 sequences constitute putatively secreted peptides (Tab. 6). Of these, less than 40 (<26%) could be annotated (Blastx, E-10, excluding ‘hypothetical protein’ hits). This low annotation success is most likely due to the predominance of repetitive low complexity domains (RLCDs) that are characteristic for mollusc mantle secretomes (e.g. Jackson et al., 2010). Most of the unknown sequences contain highly repetitive motives and a characteristic amino acid composition. 103 sequences are very rich in Gly, Tyr and Ser. Of these, a total of 88 sequences have a Gly content of greater 10% (Gly – rich), with maximum values of >50% in 18 sequences. Only 9 of these 88 sequences could be annotated. On average, these sequences are rich (i.e. >5% of a specific amino acid) in Gly (36%), Tyr (10%), Ser (6%), Asn (6%) and Val (5%) and are basic (pI = 8.1). These 88 sequences are almost exclusively expressed in the outer mantle and constitute a fraction of 42% of secreted reads in the outer mantle. A second sub-group (Ser – rich, Ser >10%) contains 32 sequences with a share of 11% of all secreted reads in the mantle margin and an average predominant amino acid composition of Gly (20%), Ser (15%), Lys (7%), Tyr (7%), Val (6%), Asn (5%) and an average pI of 8.8. A third sub-group is comprised of 33 tyrosine – rich peptides (Tyr – rich, Tyr >10%) with an average amino acid composition of Gly (47%), Tyr (16%), Ser (6%) and Val (5%) and a fraction of 10% of all secreted mantle margin reads (pI 8.2). We could not annotate any of these sequences.

Most secreted sequences are basic, with 70 sequences possessing a hypothetical pI of >9.0, while 22 were characterized by a pI of 5.0 or lower. The basic sequences account for 61% of all secreted outer mantle reads, while acidic sequences account for 10% of secreted outer mantle reads. The average, dominant amino acid composition of these basic sequences is Gly (27%), Ser (7%), Tyr (7%), Val (6%), Lys (6%), Asn (5%), Arg (5%), Leu (5%), while the acidic peptides are mainly composed of Gly (19%), Glu (10%), Asp (7%), Val (7%), Tyr (6%), Pro (6%), Ala (5%), Thr (5%), Asn (5%). Using alignments and phylogenetic clustering, we identified several groups of non-annotated sequences within the group of putatively secreted peptides. Here, we found one group containing 16 Gly - rich sequences that all share a highly conserved domain (see Fig. S1). Amino acid sequence analysis revealed that 28-47% of each sequence consists of Gly. The second most abundant amino acid is either Ser (7-9%), Asn (11-17%), Leu (7-9%) or Ile (7-9%), and in one case (#3868) Ala (10%). Together, these sequences constitute 13% of all sequenced reads in the outer mantle. All 16 sequences are exclusively expressed in the mantle margin. Conserved amino acid motives are also found in smaller groups (3-5) of sequences (see Fig. S1).

Tab. 5: Description see page 45

Contig #	Contig full name	Sequence description	Hit accession #	E value	central mantle reads/mill	mantle margin reads/mill	haemocytes reads/mill	tissue mix reads/mill
6797	Mytilus.edulis.20100630.6797	a-kinase anchor protein 13	XP_005091098	1,14E-175	41	127	55	6
2695	Mytilus.edulis.20100630.2695	actin-binding protein anillin	EKC24313	0	64	107	0	0
32836	Mytilus.edulis.20100630.32836	activating signal cointegrator 1 complex subunit 1	EKC34872	2,22E-142	41	101	88	0
35931	Mytilus.edulis.20100630.35931	adenylate kinase isoenzyme 1	EKC37610	9,079E-87	52	422	39	18
55369	Mytilus.edulis.20100630.55369	antigen w-67	EKC25595	417	174	11	6	0
27051	Mytilus.edulis.20100630.27051	asparagine synthetase	EKC26133	0	6	121	0	0
4465	Mytilus.edulis.20100630.4465	atp synthase f0 subunit 6	ABY20687	6,43E-124	3720	429	33	42
3051	Mytilus.edulis.20100630.3051	bah and coiled-coil domain-containing protein 1	EKC41194	2,907E-20	0	127	22	12
1537	Mytilus.edulis.20100630.1537	basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core 1	XP_004005424	7,484E-13	10	751	0	18
47129	Mytilus.edulis.20100630.47129	basic protein n23	AFJ19278	1,874E-21	6	107	0	0
50787	Mytilus.edulis.20100630.50787	beta-amyloid precursor protein	AA707668	2,23E-101	52	255	33	18
38277	Mytilus.edulis.20100630.38277	N,N'-diacetylchitinase	EKC19698	0	0	462	0	0
4581	Mytilus.edulis.20100630.4581	bifunctional purine biosynthesis protein purh-like	XP_005108469	0	237	121	17	6
24128	Mytilus.edulis.20100630.24128	btb and math domain-containing protein 42	EKC23166	1,104E-81	312	174	6	6
7533	Mytilus.edulis.20100630.7533	c1q domain containing protein	CBX41718	7,125E-23	0	429	0	0
44526	Mytilus.edulis.20100630.44526	c1q domain containing protein 1q6	CBX41655	1,93E-119	984	3532	0	206
25546	Mytilus.edulis.20100630.25546	c1q domain containing protein 1q95	CBX41744	3,006E-23	0	241	0	0
48289	Mytilus.edulis.20100630.48289	c1q domain containing, cathepsin, hip	AAQ63463	9,405E-54	35	141	0	0
7925	Mytilus.edulis.20100630.7925	carbonic anhydrase 14	EKC33179	3,139E-66	0	188	0	0
4251	Mytilus.edulis.20100630.4251	carbonic anhydrase 2	EKC32354	3,997E-12	0	147	0	0
5461	Mytilus.edulis.20100630.5461	catechol - dioxygenase	EKC22022	1,075E-44	0	161	0	0
28454	Mytilus.edulis.20100630.28454	ccr4-not transcription complex subunit 1 isoform 1	AAQ52660	4,539E-38	110	355	50	0
47828	Mytilus.edulis.20100630.47828	chitin deacetylase isoform b	EKC29257	0	87	168	0	0
64848	Mytilus.edulis.20100630.64848	chitin synthase	ABQ08059	0	35	181	0	0
43752	Mytilus.edulis.20100630.43752	chitinase 3	AF053261	0	41	188	0	6
3920	Mytilus.edulis.20100630.3920	chitinase-1 isoform 1	XP_001578594	3,4E-117	2650	1151	39	12
39332	Mytilus.edulis.20100630.39332	chorion peroxidase	EKC18259	7,33E-143	0	348	0	0
44677	Mytilus.edulis.20100630.44677	chorion peroxidase	EKC26108	3,49E-134	0	194	0	0
58942	Mytilus.edulis.20100630.58942	chorion peroxidase	EKC18259	5,15E-130	0	831	0	0
4928	Mytilus.edulis.20100630.4928	coiled-coil domain-containing protein 37	PB3425	8,82E-99	301	362	11	12
51467	Mytilus.edulis.20100630.51467	coiled-coil domain-containing protein 9	EKC36981	2,395E-59	17	107	0	0
3495	Mytilus.edulis.20100630.3495	cold shock domain protein A short-like	XP_0023732435	9,426E-50	2748	4906	1038	479
17323	Mytilus.edulis.20100630.17323	collagen alpha-1 chain	EKC24808	1,667E-74	75	911	0	36
33969	Mytilus.edulis.20100630.33969	collagen alpha-1 chain	EKC22014	3,48E-134	82	323	17	0
8881	Mytilus.edulis.20100630.8881	collagen alpha-1 chain-like	EKC19703	1,998E-58	145	3773	0	134
41568	Mytilus.edulis.20100630.41568	collagen alpha-2 chain	EKC24808	2,108E-61	29	335	0	6
17298	Mytilus.edulis.20100630.17298	collagen alpha-3 chain	XP_005108906	2,39E-113	17	114	0	0
42532	Mytilus.edulis.20100630.42532	conserved hypothetical protein	XP_001960465	1,173E-11	0	121	17	0
24182	Mytilus.edulis.20100630.24182	cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1 isoform 1	EKC30480	1,209E-36	278	221	39	6
26191	Mytilus.edulis.20100630.26191	cyclophilin	NP_990792	9,436E-80	23	188	66	18
21709	Mytilus.edulis.20100630.21709	cysteine-rich secretory protein lcc1 domain-containing 2	EKC31006	8,477E-88	0	114	0	0
4729	Mytilus.edulis.20100630.4729	dna polymerase epsilon subunit 3	XP_003122132	4,773E-50	729	308	33	18
26574	Mytilus.edulis.20100630.26574	elongator complex protein 1	EKC23194	3,64E-139	81	338	13	0
14595	Mytilus.edulis.20100630.14595	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit g	EKC19336	1,94E-153	145	221	11	12
2219	Mytilus.edulis.20100630.2219	f-box domain containing protein	P04927	6,62E-23	81	101	0	0
10252	Mytilus.edulis.20100630.10252	ferric-chelate reductase 1	EKC28987	5,94E-20	0	201	0	0
48787	Mytilus.edulis.20100630.48787	ferric-chelate reductase 1	EKC28987	1,754E-62	0	121	0	0
3003	Mytilus.edulis.20100630.3003	fibrillar collagen	BAA75668	1,329E-46	139	3237	6	109
9589	Mytilus.edulis.20100630.9589	galaxin-like 1	XP_002610537	2,665E-26	6	777	0	0
7380	Mytilus.edulis.20100630.7380	GalNAc/Gal-specific lectin	EY80387	6,547E-54	93	101	0	0
14110	Mytilus.edulis.20100630.14110	h sca ribonucleoprotein complex subunit 3	XP_001743747	1,147E-25	210	101	50	0
5896	Mytilus.edulis.20100630.5896	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1	AAW84264	1,699E-88	133	114	39	0
47469	Mytilus.edulis.20100630.47469	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	EKC25317	0	284	141	44	6
2498	Mytilus.edulis.20100630.2498	hip	CAE81917	3,82E-135	7614	20165	55	1899
59404	Mytilus.edulis.20100630.59404	hip, mytcd ame: full=heavy metal-binding protein hip	PB3425	3,549E-29	107	107	0	0
60864	Mytilus.edulis.20100630.60864	hip, mytcd ame: full=heavy metal-binding protein hip	PB3425	1,139E-32	6	114	0	0
54469	Mytilus.edulis.20100630.54469	homeobox msx1 protein	EKC33079	2,481E-90	29	107	0	0
58926	Mytilus.edulis.20100630.58926	homeobox protein nrx-2.5 tinman	AAV85465	1,105E-56	23	101	618	0
4217	Mytilus.edulis.20100630.4217	hypothetical protein CGI_100021217	EKC20871	5,005E-25	0	322	0	0
4878	Mytilus.edulis.20100630.4878	hypothetical protein CGI_10005171	EKC19583	7,729E-57	46	101	0	0
61698	Mytilus.edulis.20100630.61698	hypothetical protein CGI_10008122	EKC41245	1,453E-11	110	281	149	12
29987	Mytilus.edulis.20100630.29987	hypothetical protein CGI_10008425	EKC18184	1,266E-23	0	101	0	24
29953	Mytilus.edulis.20100630.29953	hypothetical protein CGI_10013964	EKC29917	2,262E-47	35	101	0	0
62914	Mytilus.edulis.20100630.62914	hypothetical protein CGI_10014320	EKC33329	1,267E-65	58	529	0	0
56140	Mytilus.edulis.20100630.56140	hypothetical protein CGI_10016777	EKC18017	1,381E-29	0	2627	0	0
4664	Mytilus.edulis.20100630.4664	hypothetical protein CGI_10017367	EKC25858	8,34E-24	75	355	767	24
2370	Mytilus.edulis.20100630.2370	hypothetical protein CGI_10019519	EKC27443	1,843E-48	0	107	0	0
1652	Mytilus.edulis.20100630.1652	hypothetical protein CHLREDRAFT_175575 [Chlamydomonas]	XP_001696023.1	2E-14	75	523	72	12
50940	Mytilus.edulis.20100630.50940	hypothetical protein OXYTRI_22334	EY80276	1,749E-12	208	369	17	0
64737	Mytilus.edulis.20100630.64737	Integrin alpha-5	Q05049	5,15E-24	0	107	0	0
55139	Mytilus.edulis.20100630.55139	iq domain-containing protein	EKC23233	4,48E-133	35	201	0	6
17887	Mytilus.edulis.20100630.17887	L-rhamnose-binding lectin CSL3	EKC26176	6,227E-30	17	121	0	0
44321	Mytilus.edulis.20100630.44321	laminin subunit beta-1	XP_005110416	0	52	107	39	0
17665	Mytilus.edulis.20100630.17665	leukocyte elastase inhibitor	EKC36644	1,385E-64	261	101	0	0
14965	Mytilus.edulis.20100630.14965	lipopolysaccharide-induced trnf-alpha factor	EKC33599	2,028E-24	6	107	0	0
51449	Mytilus.edulis.20100630.51449	low-density lipoprotein receptor-related	XP_005097701	4,985E-14	29	107	0	0
14145	Mytilus.edulis.20100630.14145	lsm14a protein	EKC41375	9,556E-45	145	101	11	0
11221	Mytilus.edulis.20100630.11221	masquerade-specific cell surface glycoprotein / alkaline phosphatase	EKC31957	6,75E-45	194	6	14	0
14439	Mytilus.edulis.20100630.14439	Metalloproteinase inhibitor 3 [Crassostrea gigas]	EKC31955.1	4E-10	0	1079	0	0
13258	Mytilus.edulis.20100630.13258	monamine oxidase	NP_001191524	6,325E-68	0	121	0	0
36120	Mytilus.edulis.20100630.36120	morc family cw-type zinc finger protein 2	EKC20475	2,61E-154	17	181	6	6
3180	Mytilus.edulis.20100630.3180	mp, pinna ame: full=mantle protein short-mv flag: precursor	EKC25858	1,588E-18	12	4028	0	0
7717	Mytilus.edulis.20100630.7717	myosin heavy chain	CAE64663	0	46	1903	0	30
49190	Mytilus.edulis.20100630.49190	myosin heavy chain	AAQ52842	0	41	2339	6	103
8101	Mytilus.edulis.20100630.8101	myosin heavy non-muscle-like	XP_005096513	0	503	1273	1982	121
12316	Mytilus.edulis.20100630.12316	MYT3, MYT3ARcName: Full=Mytilin-3; AltName: Full=Mytilus Nuclein-like	XP_005096513	3,75E-41	231	362	0	0
38555	Mytilus.edulis.20100630.38555	Nuclein-like	EKC31955.1	1,35E-174	0	1262	0	0
34814	Mytilus.edulis.20100630.34814	neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7-like	EKC37993	4,35E-53	17	107	0	0
44637	Mytilus.edulis.20100630.44637	nuclear protein 58	EKC30477	0	573	730	77	30
11198	Mytilus.edulis.20100630.11198	nucleolin	XP_005098511	2,286E-54	370	784	155	73
4700	Mytilus.edulis.20100630.4700	organic cation transporter protein	EKC23194	1,19E-154	107	402	0	0
3175	Mytilus.edulis.20100630.3175	perlecan like	PB6854.1	8,67E-38	0	181	0	0
58986	Mytilus.edulis.20100630.58986	phosphoenolpyruvate carboxykinase	EKC27095	0	23	114	110	0
3931	Mytilus.edulis.20100630.3931	plasminogen	EKC22375	2,702E-54	0	1367	0	6
4454	Mytilus.edulis.20100630.4454	plasminogen	EKC22375	2,734E-45	0	121	0	0
8322	Mytilus.edulis.20100630.8322	plasminogen	EKC26320	9,929E-65	0	1588	0	6
48520	Mytilus.edulis.20100630.48520	plasminogen	EKC22375.1	1,03E-20	0	362	0	6
4267	Mytilus.edulis.20100630.4267	platelet-activating factor acetylhydrolase ib subunit alpha	XP_005109627	0	52	107	44	0
53428	Mytilus.edulis.20100630.53428	polycomb protein eed	XP_003219406	2,7E-135	29	107	0	0
18102	Mytilus.edulis.20100630.18102	PR domain zinc finger protein 10	EKC19094	1,411E-67	156	101	0	6
58439	Mytilus.edulis.20100630.58439	predicted protein	XP_001636552	1,938E-16	0	235	0	0
15981	Mytilus.edulis.20100630.15981	probable atp-dependent ma helicase ddx10	ELU07175	0	127	147	66	12
24983	Mytilus.edulis.20100630.24983	protein boule	XP_005103136	4,912E-65	231	107	0	0
7406	Mytilus.edulis.20100630.7406	protein cbg25024	EGT57415	1,815E-13	29	389	61	30
2541	Mytilus.edulis.20100630.2541	protein roadkill	EKC29418	4,75E-102	29	141	11	6
51592	Mytilus.edulis.20100630.51592	chitin-bd-like (BMSP?)	PB6860	2,795E-39	17	141	0	0
3428	Mytilus.edulis.20100630.3428	perlwin-like	PB6865	2,735E-51	1499	529	0	0
2479	Mytilus.edulis.20100630.2479	radial spoke head 1 homolog	ELT97934	4,05E-86	382	1059	0	7
39164	Mytilus.edulis.20100630.39164	receptor-transporting protein 3	EKC32367	1,938E-89	52	201	0	18
2944	Mytilus.edulis.20100630.2944	rna methyltransferase 3-like isoform 2	EKC33861	8,26E-164	532	811	188	79
7391	Mytilus.edulis.20100630.7391	sarcoplasmic calcium-binding protein	EKC29122	1,678E-34	399	489	6	42
46744	Mytilus.edulis.20100630.46744	sarcoplasmic calcium-binding protein	EKC29123	9,843E-78	0	201	0	18
41429	Mytilus.edulis.20100630.41429	scaffold attachment factor b1-like	EKC32262	3,872E-41	29	114	22	0
2464	Mytilus.edulis.20100630.2464	septin-7 isoform 2	EKC21442	0	231	509	265	36
40526	Mytilus.edulis.20100630.40526	serine threonine-protein kinase pak 1	EKC38408	4,839E-95	29	134	50	6
28562	Mytilus.edulis.20100630.28562	Serine						

Tab. 5: continued

Contig #	Contig full name	Sequence description	Hit accession #	E value	central mantle reads/mill	mantle margin reads/mill	haemocytes reads/mill	tissue mix reads/mill
4043	Mytilus_edulis_20100630_4043	vitelline coat lysin m7	AAB33368	2,64E-30	451	181	17	6
652	Mytilus_edulis_20100630_652				6	127	0	0
1107	Mytilus_edulis_20100630_1107				0	1012	0	36
1211	Mytilus_edulis_20100630_1211				0	737	0	12
1269	Mytilus_edulis_20100630_1269				0	174	0	0
1332	Mytilus_edulis_20100630_1332				23	161	0	0
1560	Mytilus_edulis_20100630_1560				35	114	0	0
1597	Mytilus_edulis_20100630_1597				0	121	0	0
1797	Mytilus_edulis_20100630_1797				12	235	0	0
2202	Mytilus_edulis_20100630_2202				0	188	0	0
2203	Mytilus_edulis_20100630_2203				0	114	0	0
2282	Mytilus_edulis_20100630_2282				0	496	0	0
2301	Mytilus_edulis_20100630_2301				0	677	0	0
2330	Mytilus_edulis_20100630_2330				0	449	0	0
2333	Mytilus_edulis_20100630_2333				0	181	0	0
2349	Mytilus_edulis_20100630_2349				0	241	0	0
2353	Mytilus_edulis_20100630_2353				0	536	0	0
2354	Mytilus_edulis_20100630_2354				0	697	0	0
2372	Mytilus_edulis_20100630_2372				0	844	0	0
2410	Mytilus_edulis_20100630_2410				0	965	0	0
2413	Mytilus_edulis_20100630_2413				0	1206	0	0
2414	Mytilus_edulis_20100630_2414				0	3639	0	0
2431	Mytilus_edulis_20100630_2431				6	2855	0	0
2444	Mytilus_edulis_20100630_2444				0	945	0	0
2467	Mytilus_edulis_20100630_2467				6	127	0	12
2487	Mytilus_edulis_20100630_2487				1122	261	0	18
2509	Mytilus_edulis_20100630_2509				1742	650	28	24
2534	Mytilus_edulis_20100630_2534				0	248	0	0
2585	Mytilus_edulis_20100630_2585				0	101	0	0
2623	Mytilus_edulis_20100630_2623				0	188	0	0
2624	Mytilus_edulis_20100630_2624				0	235	0	0
2654	Mytilus_edulis_20100630_2654				0	181	447	0
2688	Mytilus_edulis_20100630_2688				0	134	0	0
2697	Mytilus_edulis_20100630_2697				943	194	0	6
2765	Mytilus_edulis_20100630_2765				0	141	0	0
2914	Mytilus_edulis_20100630_2914				122	516	0	0
2953	Mytilus_edulis_20100630_2953				35	114	0	0
2990	Mytilus_edulis_20100630_2990				474	141	55	12
3006	Mytilus_edulis_20100630_3006				0	295	6	0
3016	Mytilus_edulis_20100630_3016				52	141	0	0
3018	Mytilus_edulis_20100630_3018				0	101	0	0
3020	Mytilus_edulis_20100630_3020				0	1830	0	0
3034	Mytilus_edulis_20100630_3034				0	932	0	0
3037	Mytilus_edulis_20100630_3037				23	174	0	0
3075	Mytilus_edulis_20100630_3075				1105	2339	171	212
3124	Mytilus_edulis_20100630_3124				0	1541	0	0
3171	Mytilus_edulis_20100630_3171				0	4839	0	0
3189	Mytilus_edulis_20100630_3189				0	449	0	0
3244	Mytilus_edulis_20100630_3244				0	442	0	0
3259	Mytilus_edulis_20100630_3259				0	697	0	0
3329	Mytilus_edulis_20100630_3329				0	878	0	0
3365	Mytilus_edulis_20100630_3365				41	101	0	0
3784	Mytilus_edulis_20100630_3784				0	121	0	0
3835	Mytilus_edulis_20100630_3835				29	161	0	0
3837	Mytilus_edulis_20100630_3837				0	3431	0	0
3839	Mytilus_edulis_20100630_3839				0	2513	0	0
3840	Mytilus_edulis_20100630_3840				0	261	0	0
3841	Mytilus_edulis_20100630_3841				0	127	0	0
3843	Mytilus_edulis_20100630_3843				0	1246	0	0
3865	Mytilus_edulis_20100630_3865				0	1059	0	0
3867	Mytilus_edulis_20100630_3867				0	2131	0	0
3868	Mytilus_edulis_20100630_3868				0	275	0	0
3869	Mytilus_edulis_20100630_3869				0	3076	0	0
3917	Mytilus_edulis_20100630_3917				0	328	0	0
3918	Mytilus_edulis_20100630_3918				0	603	0	0
3987	Mytilus_edulis_20100630_3987				0	456	0	0
3998	Mytilus_edulis_20100630_3998				0	302	0	0
4054	Mytilus_edulis_20100630_4054				0	241	0	0
4063	Mytilus_edulis_20100630_4063				0	355	0	0
4128	Mytilus_edulis_20100630_4128				243	114	22	0
4182	Mytilus_edulis_20100630_4182				0	1106	0	0
4195	Mytilus_edulis_20100630_4195				0	281	0	0
4291	Mytilus_edulis_20100630_4291				17	141	0	0
4338	Mytilus_edulis_20100630_4338				330	3398	0	0
4342	Mytilus_edulis_20100630_4342				0	429	0	0
4374	Mytilus_edulis_20100630_4374				0	114	0	0
4379	Mytilus_edulis_20100630_4379				0	127	0	0
4390	Mytilus_edulis_20100630_4390				0	168	0	0
4588	Mytilus_edulis_20100630_4588				700	369	0	0
4589	Mytilus_edulis_20100630_4589				0	516	0	0
4601	Mytilus_edulis_20100630_4601				127	1649	0	0
4701	Mytilus_edulis_20100630_4701				1175	1702	17	42
4740	Mytilus_edulis_20100630_4740				0	281	0	0
4844	Mytilus_edulis_20100630_4844				0	322	0	24
5028	Mytilus_edulis_20100630_5028				0	107	0	0
5303	Mytilus_edulis_20100630_5303				0	268	0	0
5466	Mytilus_edulis_20100630_5466				0	268	0	0
6081	Mytilus_edulis_20100630_6081				0	181	0	0
6460	Mytilus_edulis_20100630_6460				0	281	0	0
6534	Mytilus_edulis_20100630_6534				0	114	0	0
6554	Mytilus_edulis_20100630_6554				0	114	0	0
6635	Mytilus_edulis_20100630_6635				0	288	0	0
6714	Mytilus_edulis_20100630_6714				0	496	0	0
6752	Mytilus_edulis_20100630_6752				0	107	0	0
6888	Mytilus_edulis_20100630_6888				0	248	0	12
6894	Mytilus_edulis_20100630_6894				0	255	0	0
7125	Mytilus_edulis_20100630_7125				0	114	0	0
7233	Mytilus_edulis_20100630_7233				6	415	0	0
7385	Mytilus_edulis_20100630_7385				0	362	0	0
7552	Mytilus_edulis_20100630_7552				0	121	0	0
7829	Mytilus_edulis_20100630_7829				6	322	0	0
7873	Mytilus_edulis_20100630_7873				41	114	22	0
7906	Mytilus_edulis_20100630_7906				12	302	6	0
7911	Mytilus_edulis_20100630_7911				411	141	6	12
7946	Mytilus_edulis_20100630_7946				0	121	0	0
7956	Mytilus_edulis_20100630_7956				52	114	94	0
8021	Mytilus_edulis_20100630_8021				0	174	0	0
8039	Mytilus_edulis_20100630_8039				0	348	0	0
8277	Mytilus_edulis_20100630_8277				0	208	0	0
8357	Mytilus_edulis_20100630_8357				0	355	0	0
8378	Mytilus_edulis_20100630_8378				29	523	0	18
8394	Mytilus_edulis_20100630_8394				0	275	0	0
8399	Mytilus_edulis_20100630_8399				608	208	0	0
8472	Mytilus_edulis_20100630_8472				0	1702	0	0
8955	Mytilus_edulis_20100630_8955				6	181	0	0
9239	Mytilus_edulis_20100630_9239				29	389	0	0
9386	Mytilus_edulis_20100630_9386				0	141	0	6
9877	Mytilus_edulis_20100630_9877				87	576	11	0
9949	Mytilus_edulis_20100630_9949				0	228	0	0
10368	Mytilus_edulis_20100630_10368				0	107	0	0
10608	Mytilus_edulis_20100630_10608				64	114	28	0
10627	Mytilus_edulis_20100630_10627				0	168	0	0
10796	Mytilus_edulis_20100630_10796				0	134	0	0
13009	Mytilus_edulis_20100630_13009				12	121	0	0
13479	Mytilus_edulis_20100630_13479				0	335	0	0
13628	Mytilus_edulis_20100630_13628				0	188	0	0
14035	Mytilus_edulis_20100630_14035				35	168	0	0
14205	Mytilus_edulis_20100630_14205				41	395	0	0
14487	Mytilus_edulis_20100630_14487				0	107	0	0
15072	Mytilus_edulis_20100630_15072				81	275	77	24
15329	Mytilus_edulis_20100630_15329				0	570	0	0
16295	Mytilus_edulis_20100630_16295				17	141	11	12
16950	Mytilus_edulis_20100630_16950				6	101	0	0
18198	Mytilus_edulis_20100630_18198				0	181	0	0
18724	Mytilus_edulis_20100630_18724				0	114	0	0
19375	Mytilus_edulis_20100630_19375				0	181	0	0
20217	Mytilus_edulis_20100630_20217				579	147	17	12
20539	Mytilus_edulis_20100630_20539				0	134	0	0

Tab. 5: continued

Contig #	Contig full name	Sequence description	Hit accession #	E value	central mantle reads/mill	mantle margin reads/mill	haemocytes reads/mill	tissue mix reads/mill
20967	Mytilus_edulis_20100630_20967				0	724	0	0
21496	Mytilus_edulis_20100630_21496				41	114	0	0
23132	Mytilus_edulis_20100630_23132				17	107	0	0
23491	Mytilus_edulis_20100630_23491				0	134	0	0
23567	Mytilus_edulis_20100630_23567				0	114	0	0
24599	Mytilus_edulis_20100630_24599				0	965	0	0
24624	Mytilus_edulis_20100630_24624				29	261	0	24
32413	Mytilus_edulis_20100630_32413				0	114	0	0
34157	Mytilus_edulis_20100630_34157				0	141	0	0
36245	Mytilus_edulis_20100630_36245				185	114	204	6
36363	Mytilus_edulis_20100630_36363				0	248	0	6
36546	Mytilus_edulis_20100630_36546				0	154	0	0
37802	Mytilus_edulis_20100630_37802				0	121	0	0
37839	Mytilus_edulis_20100630_37839				0	422	0	0
38639	Mytilus_edulis_20100630_38639				116	114	0	0
40489	Mytilus_edulis_20100630_40489				0	107	0	0
40515	Mytilus_edulis_20100630_40515				0	161	0	0
40690	Mytilus_edulis_20100630_40690				0	101	0	0
41011	Mytilus_edulis_20100630_41011				35	168	55	12
41022	Mytilus_edulis_20100630_41022				0	107	0	0
41182	Mytilus_edulis_20100630_41182				0	456	0	0
41544	Mytilus_edulis_20100630_41544				0	281	0	0
41628	Mytilus_edulis_20100630_41628				12	127	0	6
41698	Mytilus_edulis_20100630_41698				0	114	0	0
42805	Mytilus_edulis_20100630_42805				0	107	0	0
43026	Mytilus_edulis_20100630_43026				0	141	0	0
43040	Mytilus_edulis_20100630_43040				0	114	0	0
43044	Mytilus_edulis_20100630_43044				0	101	0	0
44093	Mytilus_edulis_20100630_44093				0	241	0	12
44133	Mytilus_edulis_20100630_44133				0	255	0	0
46858	Mytilus_edulis_20100630_46858				0	335	0	0
47000	Mytilus_edulis_20100630_47000				0	288	0	0
47230	Mytilus_edulis_20100630_47230				0	154	0	0
47427	Mytilus_edulis_20100630_47427				0	107	0	0
47648	Mytilus_edulis_20100630_47648				0	724	0	0
48239	Mytilus_edulis_20100630_48239				0	154	0	0
48388	Mytilus_edulis_20100630_48388				0	154	0	0
49140	Mytilus_edulis_20100630_49140				23	462	0	0
49149	Mytilus_edulis_20100630_49149				0	101	0	0
50374	Mytilus_edulis_20100630_50374				0	194	0	0
50479	Mytilus_edulis_20100630_50479				0	201	0	0
51885	Mytilus_edulis_20100630_51885				0	670	0	0
53659	Mytilus_edulis_20100630_53659				17	107	0	0
55021	Mytilus_edulis_20100630_55021				0	181	0	0
55365	Mytilus_edulis_20100630_55365				0	422	0	0
55374	Mytilus_edulis_20100630_55374				0	342	0	0
57072	Mytilus_edulis_20100630_57072				52	697	0	0
58384	Mytilus_edulis_20100630_58384				0	121	0	0
59953	Mytilus_edulis_20100630_59953				0	154	0	0
60302	Mytilus_edulis_20100630_60302				0	369	0	0
65308	Mytilus_edulis_20100630_65308				0	127	0	0

Tab. 5: List of the 327 transcripts that were at least expressed more than 100 reads per million sequenced reads in the mantle marginal and pallial zones (outer mantle) and at least 10-fold higher expressed in the outer mantle than in the mixed transcriptome made from gill, foot, adductor muscle and digestive gland. The list includes contig numbers, full names of the contigs, sequence descriptions, accession numbers, E values and the respective reads per million from central mantle, mantle margin, haemocytes and tissue mix. Contigs used for the gene expression study are highlighted in grey.

Tab. 6: List of the 155 transcripts from Tab. 5 that were characterized by signal sequences. The list includes contig numbers, sequence descriptions, accession numbers, E values, the respective reads per million from central mantle, mantle margin, haemocytes and tissue mix, amino acid sequence and respective length, the distribution of single amino acids, the respective isoelectric point (pI) and the grand average of hydropathicity (GRAVY). Bold values indicate amino acid percentages higher than 10. Contigs used for the gene expression study are highlighted in grey.

46

Tab.6: continued

[illegible]

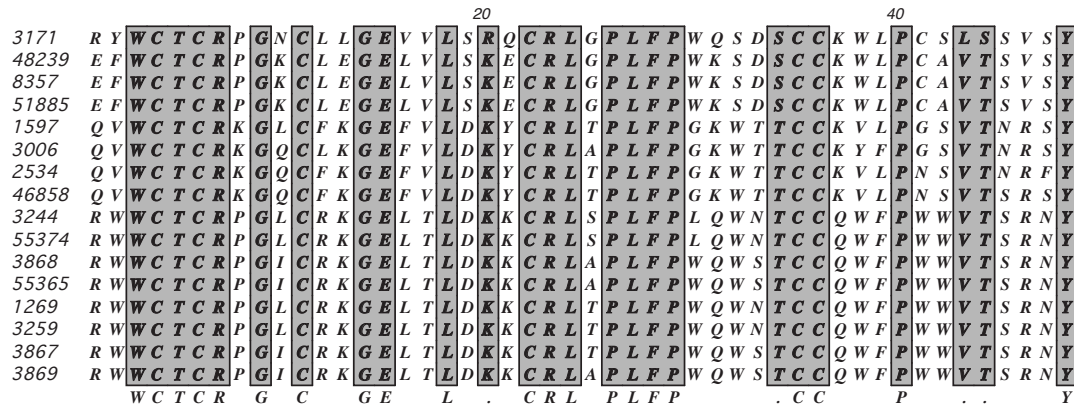


Fig. S1: Alignment of conserved amino acid motives from 16 Gly-rich sequences from mantle. Numbers indicate contig #.

Gene expression patterns during shell regeneration

Gene expression changes for a range of candidate genes were determined in outer (pallial and marginal) and inner (central) *M. edulis* mantle tissue during the regeneration phase after shell damage. Both tissues supposedly are involved in the biomineralization process, with the outer mantle being responsible for periostracum, calcite and aragonite- and the central mantle zone being involved in aragonite formation.

After injury, the expression of four genes (Fig. 3 A-D) was significantly increased in inner mantle tissue underlying the injured valve with respect to expression levels in the tissue underlying the non-injured valve. The expression of TYR3 was elevated at each point of time, but decreased during the time course of regeneration (29-fold at day 20 to 8-fold at day 36) (Fig. 3A). The expression of TYR6 (Fig. 3B) was significantly enhanced at day 20 (5-fold) and declined with time. Transcript abundances of p4338 (Fig. 3C) were elevated in a comparable range (6-4-fold) at each point of time. While at day 20, no alteration in NACR expression (Fig. 3D) could be detected, transcript abundances were increased approx. 100-fold compared to control inner mantle at day 29 and stayed enhanced on day 36.

The expression of three genes (Fig. 3B, E, F) increased time dependently in the outer mantle (TYR6: control site: 4-fold; TYR2: drilled site: max. 15-fold; CPEROX: drilled and control site: max. 6-fold). Gene expression of TYR1, CA, CNN, and CHS was not significantly affected by shell injury (Fig. 3G-J).

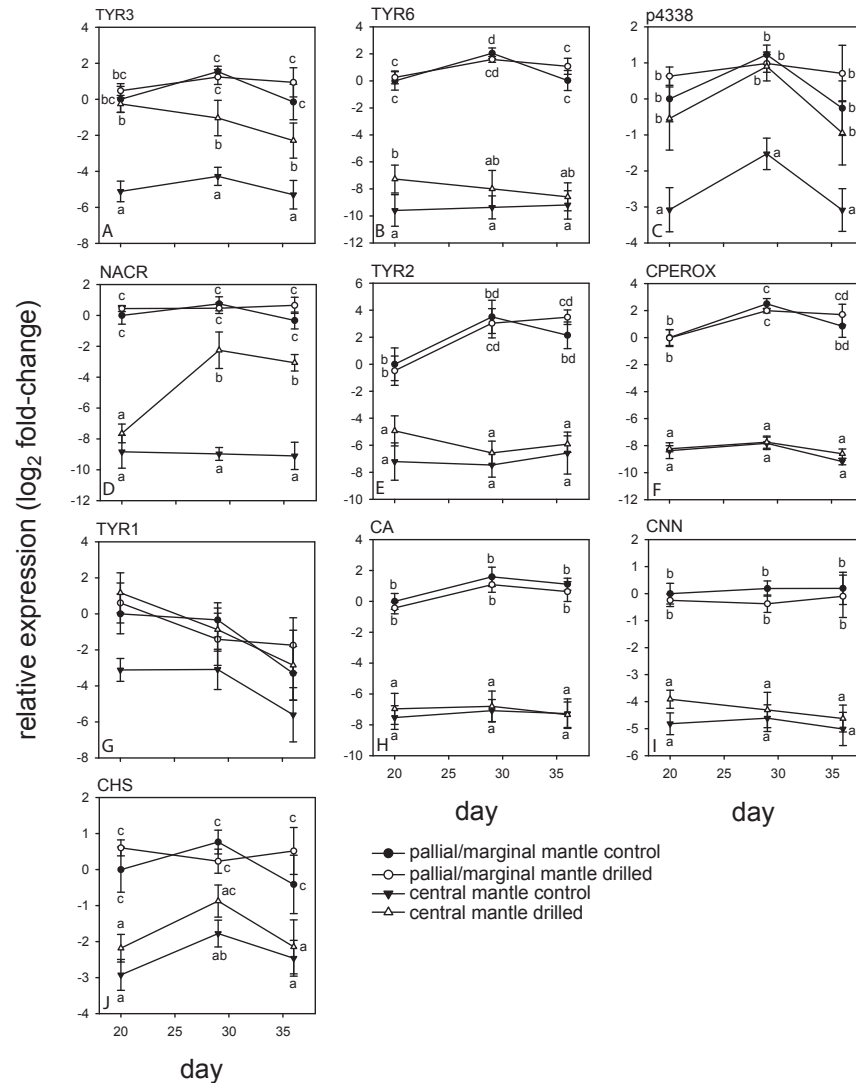


Fig. 3: Relative expression values of several genes putatively involved in shell formation. Mean values per time and tissue are given with their respective standard errors. Open triangles: central mantle (drilled), filled triangles: central mantle (control), open circles: pallial/marginal mantle (drilled), filled circles: pallial/marginal mantle (control); small letters denote significant expression changes based on post-hoc test (Student-Newman-Keuls) between regeneration day and tissues. A: tyrosinase TYR3, B: tyrosinase TYR6, C:-- p4338, D: nacrein-like protein NACR, E: tyrosinase TYR2, F: chorion peroxidase CPEROX, G: tyrosinase TYR1, H: carbonic anhydrase CA, I: calponin-like protein CNN, J: chitin synthase CHS.

Discussion

In this study, we utilized shell-repair processes in *M. edulis* to investigate whether expression of outer mantle specific genes can be induced in inner mantle tissues underlying the site of shell injury. A second goal of our study was to test, whether expression patterns of such typically non-expressed genes can be linked to specific phases of the shell repair process. Candidate genes were obtained using transcriptome sequencing of various tissues and studied using quantitative real-time PCR. Shell regenerates were characterized using stereo microscopy, SEM and Raman spectroscopy.

Shell regeneration

Our structural observations during the shell regeneration process indicate that an initially precipitated organic matrix sheet provides the substrate for subsequent calcite and aragonite deposition. This chronological hierarchy in shell repair goes in line with observations made by previous shell-repair studies on bivalve molluscs, including the genus *Mytilus* (Beedham, 1965; Menakshi et al., 1973; Uozumi and Suzuki, 1979).

After 20 days of shell-repair, a newly formed organic sheet was exclusively located underneath the damaged shell parts in all specimens, with a fragile to rigid structure comparable to that reported by a previous histological study in *M. edulis* (Uozumi and Suzuki, 1979). This sheet sealed off the drilled area from the extrapallial space, thereby forming a protective layer against the outer environment. Apparently, rapid synthesis of an organic layer is required to protect the animal from intruders and/or to separate the extrapallial fluid (Harper, 1997; Clark, 1976), thus providing an environment to continue biomineralization. The area over which the organic layer (similar to periostracum) was deposited (central shell region) had no contact with outer mantle fold epithelial cells, that are typically involved in secretion of periostracum under normal conditions (Beedham, 1958; Marin et al., 2007). At this time point, first calcitic structures arose from the organic matrix in 67% of the specimens that reflect the chronology in matrix-mediated mineralization.

During early shell-repair, observations of wandering granule-containing cells to the surface of the epithelium have been made in the bivalve *Musculus senhousia* (Kawaguti and Ikemoto, 1962). Additionally, Johnstone et al. (2008) described a phosphoprotein from shell matrix, which was circulating continuously in the haemolymph and was apparently secreted from haemocytes at the onset of shell repair in the oyster *Crassostrea virginica*, indicating a direct involvement of the immune system in biomineralization. Dunachie (1963) reported that amoebocytes migrated into outer fold mantle epithelial cells of *Mytilus edulis* three days after damage of posterior shell parts. He suggested that these cells supply the material for the synthesis of the periostracum during the regeneration process. An immediate increase in haemocytes was also detected in mantle tissue following injury of central shell parts (Beedham,

1965; Saleuddin, 1967). More recent studies reported cellular crystal or calcium transport towards the site of mineralization by haemocytes during shell regeneration (Mount et al., 2004; Kadar et al., 2008). Increase in circulating haemocytes as a first reaction towards shell damage might therefore either favour crystal deposition or be exclusively related to immediate immune response as the number of haemocytes decreased after several days. Our haemocyte transcriptome does not indicate expression of genes involved in the biomineralization process (Tab. 5). However, our data is not sufficient to exclude a role of haemocytes in the initial stages of the shell regeneration process.

At day 29, irregular growth directions of calcitic prisms were observed on all regenerates. Similarly orientated prisms had been observed in *M. edulis* after damage of central shell parts by Meenakshi et al. (1973). Polymorph chronology in the ongoing repair-process was reflected by formation of aragonite crystals with tabloid shape on day 36 in 33% of the specimens.

Mantle transcriptome

We used transcriptome sequencing to identify candidate genes that are vital for the biomineralization process. From the 327 sequences obtained from our screen, many are homologous to sequences previously associated with biomineralization in other bivalves and molluscs in general (Zhang et al., 2012; Clark et al., 2010; Jackson et al., 2010). Most notably, transcripts coding for five (contigs: #12316, musp-3; #39557, nacrein-like; #3175, perlucin-like; #3428, perlwapin-like, #51592, chitin-bd-like) out of nine proteins that were recently extracted from the mytilid shell matrix using proteomic techniques (Marie et al., 2011), are part of our biomineralization candidate gene enriched list. This renders validity to our screening approach.

Among the sequences that could be annotated, we found groups of transcripts that have previously been associated with biomineralization. A number of chitin – metabolizing enzymes are among the highly expressed inner and outer mantle transcripts. These genes are involved in chitin degradation (contigs: #38277, diacetylchitobiase; #47828, chitin deacetylase; #43752, chitinase ; #3920, chitotriosidase) chitin synthesis (#64848, chitin synthase) as well as chitin binding (#51592). Chitin is a major component of the organic matrix scaffold of mytilid shells (e.g. Weiss and Schönlitzer, 2006; Schönlitzer and Weiss 2007). A chitin synthase was found to be expressed in shell forming tissue of larval *M. galloprovincialis* (Weiss et al., 2006) and inhibition of chitin synthases via Nikkomycin Z resulted in malformation of larval shells (Schönlitzer and Weiss, 2007). Suzuki et al. (2007) could identify chitin in the prismatic layer of the pearl oyster *Pinctada fucata* and cloned a chitin synthase which was expressed tissue-specifically in mantle edge and muscles. In addition, the oyster genome (*Crassostrea gigas*) project established that chitin synthase transcripts are almost exclusively expressed in mantle tissue (Zhang et al., 2012). Chitinases also have been found to be specifically expressed in

mantle tissues of bivalves (e.g. Badarotti et al., 2011) and were recently found to be induced by shell injury in the bivalve *Hyriopsis cumingii*, suggesting a role in the biomineralization process (Wang et al., 2012).

A second group of transcripts is most likely related to formation and maturation of the periostracum. Here, we found a number of highly expressed tyrosinases (#3233, #12338, #22577, #34154, #43089). In addition, we could identify two transcripts coding for ferric chelate reductases (#10252, #48787), responsible for iron reduction. It was shown, that Fe^{3+} builds complexes with dihydroxyphenylalanine (DOPA) containing proteins in mytilid byssus, thus providing cross-linking dependent flexibility in this structure (Harrington et al., 2010). As DOPA is also constituent of periostracal proteins (Waite et al., 1979; Waite and Andersen, 1980), a similar complex formation in the organic shell coating can be suggested. This assumption can be supported by presence of a ferric chelate reductase transcript detected in oyster mantle edge and pallial (Zhang et al., 2012). Moreover, we identified three chorion peroxidase transcripts (#39332, #44677, #58942) to be specifically expressed in the outer mantle tissue. For *Aedes aegypti*, it could be demonstrated, that chorion peroxidases function in hardening of the mosquitoes' eggs via protein cross-linking (Li et al., 1996; Han et al. 2000).

Further, the enriched list contains sequences that have previously been expressed in mantle tissue and have been related to biomineralization, namely sarcoplasmic calcium binding proteins (#7391, #46744), carbonic anhydrases (#4251, #7925) and a range of extracellular matrix proteins like collagens (#3003, #8881, #17323, #17298, #33969, #41568) (e.g. Zhang et al. 2012). Interestingly, one of the carbonic anhydrases (#7925) possesses a putative transmembrane domain, with the major part of the deduced protein being located in the extracellular space. It might thus function in extracellular CaCO_3 formation.

From mantle tissue of *M. edulis*, we could also identify several transcripts coding for common shell matrix proteins, like nacrein (#39557), perlwapin (#3428) and perlucin (#3175). Interestingly, nacrein and perlucin are specifically expressed in mantle edge, whereas perlwapin is mainly restricted to the central mantle zone, thus demonstrating their involvement in regulation of the different CaCO_3 polymorphs. The mantle transcriptome also reveals the presence of a transcript coding for galaxin (#9589), which is known to be a specific matrix protein from corals (Fukuda et al., 2003; Ramos-Silva et al., 2013) and has not been identified in mussels before. Additionally, 16 new transcripts from *M. edulis* with a common amino acid sequence of PFLP were first described here.

Gene expression analysis

At day 20 the expression of two out of four tyrosinases (TYR3 and 6, Fig. 3A and B) was enhanced in left inner mantle tissues, followed by a decrease in expression over time. This observation is comparable to an up-regulation of a tyrosinase transcript from oyster mantle after

shell damage (Wang et al., 2013) and indicates the involvement of these isoforms in initial organic matrix formation during the first stage of shell repair. During the mineralization process, the periostracum is synthesized as an organic template for initial crystal formation (Taylor and Kennedy, 1969; Checa, 2000; Marin et al., 2007) and tyrosinases are reported to be involved in *de novo* periostracum formation as catalysts of periostracin- and diphenol oxidation within quinone tanning processes (Waite 1983; Waite and Wilbur, 1976; Waite and Andersen, 1978, 1980; Saleuddin and Petit, 1983). In the outer epithelium cells of the outer fold of the bivalve *Anodonta grandis* an increase in total RNA concentration was measured in response to shell injury, with a maximum after 2-3 days post injury, suggesting a correlation between RNA-increase and organic matrix synthesis (Saleuddin, 1967). Almeida et al. (1998) noted an enhanced DOPA content in mantle areas underlying damaged shell parts of *Crassostrea gigas* 15 days after shell injury. Under norm conditions, the DOPA content in the newly built periostracum of *M. edulis* was higher than in older periostracum parts - an observation that is underlining the central role of DOPA as the substrate for tyrosinase-catalyzed oxidation to quinone within the quinone tanning process (Waite and Andersen 1978; Waite and Andersen 1980). Additionally, two tyrosinase transcripts were detected in mantle pallial and marginal of the oyster *Pinctada fucata* suggesting to function in shell melanogenesis (Nagai et al., 2007). Our results indicate that the expression of mantle margin specific tyrosinases is not restricted to the outer mantle tissue, but induced and enhanced in the central mantle part after shell damage. Two tyrosinase proteins were detected in the prismatic layer of *P. margaritifera* (Marie et al., 2012). This might also indicate, that tyrosinases function additionally in shell matrix modification. However, information on functional properties of various tyrosinase isoforms is yet scarce. High sequence variability and specific clustering of different *M. edulis* tyrosinases (Hüning et al., 2013) may be indicative for their diverse functions.

From day 29 on, the expression of NACR was significantly and exclusively increased in inner mantle tissues underlying the damaged shell area (Fig. 3D) and almost reached the expression levels of outer mantle tissues. Nacrein is a matrix protein that was first isolated from the nacreous layer of *P. fucata* (Miyamoto et al., 1996), and the respective mRNA transcripts were reported to be expressed in inner and outer mantle (Takeuchi and Endo, 2006). Functional properties of a calcium-binding domain and a carbonic anhydrase domain discovered in nacrein suggested primarily that this protein was favouring CaCO_3 formation (Miyamoto et al., 1996). Yet, nacrein apparently promoted inhibition of nacre formation within a more recent study (Miyamoto et al., 2005), therefore suggesting an inverse regulatory role in polymorph formation. Further detection of nacrein in the prismatic layer of *P. fucata* indicated its involvement also in the formation of calcite (Miyashita et al., 2002). As in *M. californianus*, the nacrein-like protein from *M. edulis* does not possess the Gly-X-Asn-rich region (Marie et al., 2011), which is proposed to have an inhibiting function on calcification (Miyashita et al. 2004;

Miyamoto et al., 2005). Therefore, the major function of the investigated NACR might in contrary be promoting nacre formation, supposedly by interaction of its CA- and calcium-binding domain. Yet, it is plausible, that different isoforms, changes in conformation and resulting alterations in functional properties account for either inhibitory or favourable behaviour of the protein.

During all experimental points of time, the expression of p4338 was up-regulated in inner mantle tissues of the treated shell valve (Fig. 3C). However, only little similarity with other proteins was found for p4338 on public databases. Distant, non-reliable similarities (2E-4) could be drawn with a circumsporozoite-like protein. Translation of the nucleotide sequence of the corresponding coding region revealed a protein sequence containing remarkable amounts of Asp (13.2%), Ser (11.2%), Asn (10.6%) and Gly (9.3%) and an acidic isoelectric point (5.03). While the detailed function of this novel protein remains unclear, we observed induction and/or enhancement of gene expression after shell damage and can therefore not exclude its possible involvement in shell repair. According to the expression levels over time, p4338 might furthermore play a consistent role during the entire process. A transcript coding for another Ser-Gly-Asp rich acidic protein has already been detected in the mantle of the scallop *Patinopecten yessoensis* (Sarashina and Endo, 2001) and was suggested to have a function in controlling crystal growth. Although p4338 does not show amino acid similarities with other acidic shell matrix proteins that have been proposed to play a crucial role in CaCO₃ polymorph formation, a parallel function may be suggested.

The expression of transcripts coding for a carbonic anhydrase (CA, Fig. 3H) and a calponin-like protein (CNN, Fig. 3I), responsible for bicarbonate formation and calcium ion binding, respectively, was not inducible through shell damage. We suggest that those transcripts are either not directly involved in the shell-repair process or expressed in excess under norm conditions. The latter suggestion might be transferred to expression levels of CNN, as the most abundant transcripts in mantle transcriptome of the oyster *Pinctada martensii* were coding for a calponin-like protein (Shi et al., 2013).

Following shell injury, the expression of CHS was not altered in any of the tissues (Fig. 3J). We did not expect a constant expression during the generation phase, as chitin is a substantial constituent of the organic matrix framework providing the scaffold for mineral nucleation and growth (Levi-Kalishman et al., 2001).

Conclusion

Both, the observations of regenerated shell parts and the analysis of induction and regulation of gene expression demonstrated that inner mantle epithelial cells of *M. edulis* underlying a damaged shell area were able to resume functions in the calcification process, that are normally restricted to outer mantle cells. We observed close interaction between gene

expression patterns and structural changes during a repair-process that was characterized by a chronological hierarchy: (i) periostracum secretion, (ii) calcite formation, (iii) aragonite formation. Alteration in expression levels corresponded with the demand of transcripts during the repair process as shown for TYR3+6 and NACR. TYR expression levels were highest at day 20, when an organic sheet had been formed by the animals and quinone tanning required the functional properties of tyrosinases. Highest expression levels for NACR were observed after day 29 and 36, when calcite deposition progressed on the organic sheet and an increasing amount of aragonite crystals was detectable on the mineral surface. This correlation furthermore supports the proposed role of NACR as an important mediator of aragonite crystal formation. Up-regulation of p4338 transcripts at all points of time inclines the need for further investigation on its functional properties in detail.

Our results demonstrate up-regulation in four out of the ten selected mantle margin-specific candidate genes in inner mantle tissues, indicating that tissue-related shifts in gene expression were a necessary requirement for the shell-repair process. With our approach combining transcriptome and gene expression analysis, we could verify candidate transcripts responsible for biomineralization. However, this pilot study was focussing on few genes and points of time. We propose long-time studies including expression analysis on a high-time resolution basis to elucidate the molecular network underlying shell-repair processes, to gaining a better understanding of *de novo* shell-synthesis, and accurately constrain the diverse functional roles of the involved proteins.

Funding

This study is part of the German joint project “Biological Impacts of Ocean Acidification (BIOACID)” (3.1.3) funded by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF, FKZ 03F0608B). It is associated with the PACES research program (work package 1.6) of the Alfred Wegener Institute funded by the Helmholtz Association.

References

- Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F., Weiner, S., (2006). Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chemistry - a European Journal* 12, 980-987.
- Addadi, L., Weiner, S. (1985). Interactions between acidic proteins and crystals: Stereochemical requirements in biomineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 4110-4114.
- Almeida, M. J., Machado, J., Vieira Coelho, M. A., Soares da Silva, P., Coimbra, J. (1998). L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) secreted by oysters (*Crassostrea gigas*) mantle cells: functional aspects. *Comp Biochem Physiol B* 120, 709-713.
- Ambariyanto, Seed, R. (1991). The infestation of *Mytilus edulis Linnaeus* by *Polydora ciliata* (Johnston) in the cowny estuary, North Wales. *J Mollus Stud* 57(4), 413-424.

Ambrose, W. G. Jr., Dawson, M., Gailey, C., Ledkovsky, P., O'Leary, S., Tassinary, B., Vogel, H., Wilson, C. (1998). Effects of baitworm digging on the soft-shelled clam, *Mya arenaria*, in Maine: shell damage and exposure on the sediment surface. *J Shellfish Res* 17(4), 1043-1049.

Badariotti, F., Lelong, C., Dubos, M.-P., Favrel, P. (2011). Identification of three singular glycosyl hydrolase family 18 members from the oyster *Crassostrea gigas*: Structural characterization, phylogenetic analysis and gene expression. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 158, 56-63.

Bai, Z., Yin, Y., Hu, S., Wang, G., Zhang, X., Li, J. (2010). Identification of genes potentially involved in pearl formation by expressed sequence tag analysis of mantle from freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii* Lea). *Journal of Shellfish Research* 29(2), 527-534.

Beedham, G. E. (1958). Observations on the mantle of Lamellibranchia. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 99(2), 181-197.

Beedham, G. E. (1965). Repair of the shell in species of *Anodonta*. *Proceedings of the Zoological Society of London* 145, 107-123.

Checa, A. (2000). A new model for periostracum and shell formation in Unionidae (Bivalvia, Mollusca) *Tissue Cell* 32(5), 405-416.

Clark, G. R. (1976). Shell growth in the marine environment: approaches to the problem of marginal calcification. *Amer Zool* 16, 617-626.

Clark, M. S., Thorne, M. A. S., Vieira, F. A., Cardoso, J. C. R., Power, D. M., Peck, L. S. (2010). Insights into shell deposition in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* gene discovery in the mantle transcriptome using 454 pyrosequencing. *BMC Genomics* 11, 362.

de Paula, S. M., Silveira, M. (2009). Studies on molluscan shells: contributions from microscopic and analytical methods. *Micron* 40, 669-690.

Dunachie, J. F. (1963). XV.-The periostracum of *Mytilus edulis*. *T Roy Soc Edin-Earth* 65(15), 383-411.

Falini, G., Albeck, S., Weiner, S., Addadi, L. (1996). Control of aragonite or calcite polymorphisms by mollusk shell macromolecules. *Science* 271, 67-69.

Fukuda, I., Ooki, S., Fujita, T., Murayama, E., Nagasawa, H., Isa, Y., Watanabe, T. (2003). Molecular cloning of a cDNA encoding a soluble protein in the coral exoskeleton. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304, 11-17.

Gotliv, B. A., Addadi, L., Weiner, S. (2003). Mollusk shell acidic proteins: in search of individual functions. *Chemistry – A European Journal* 4, 522-529.

Gotliv, B. A., Kessler, N., Sumerel, J. L., Morse, D. E., Tuross, N., Addadi, L., Weiner, S. (2005). Asprich: A novel aspartic acid-rich protein family from the prismatic shell matrix of the bivalve *Atrina rigida*. *Chembiochem* 6, 304-314.

Han, Q., Li, G., Li, J. (2010). Purification and characterization of chorion peroxidase from *Aedes aegypti* eggs. *Arch Biochem Biophys* 378(1), 107-115.

Harper, E. (1997). The molluscan periostracum: an important constraint in bivalve evolution. *Palaeontology* 40 (1), 71-97.

- Harper, E. M., Clark, M. S., Hoffman, J. I., Philipp E. E. R, Peck, L. S., Morley, S. A. (2012). Iceberg scour and shell damage in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. PLoS ONE 7(9), e46341.
- Harrington, M. J., Masic, A., Holten-Andersen, N., Waite, J. H., Fratzl, P. (2010). Iron-clad fibers: a metal-based biological strategy for hard flexible coatings. Science 328, 216-220.
- Hüning, A. K., Melzner, F., Thomsen, J., Gutowska, M. A., Krämer, L., Frickenhaus, S., Rosenstiel, P., Pörtner, H.-O., Philipp, E. E. R., Lucassen, M. (2013). Impacts of seawater acidification on mantle gene expression patterns of the Baltic Sea blue mussel: implications for shell formation and energy metabolism. Mar Biol 160, 1845-186.
- Jackson, D. J., McDougall, C., Woodcroft, B., Moase, B., Rose, R. A., Kube, M., Reinhardt, R., Rokhsar, D. S., Montagnani, C., Joubert, C., Piquemal D., Degnan, B. M. (2010). Parallel evolution of nacre building gene sets in molluscs. Mol Biol Evol 27(3), 591-608.
- Johnstone, M. B., Ellis, S., Mount, A. S. (2008). Visualization of shell matrix proteins in hemocytes and tissues of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. J Exp Zool (Mol Dev Evol) 310B, 227-239.
- Kadar, E., Lobo-da-Cunha, A., Azevedo, C. (2009). Mantle-to-shell CaCO₃ transfer during shell repair at different hydrostatic pressures in the deep-sea vent mussel *Bathymodiolus azoricus* (Bivalvia: Mytilidae). Mar Biol 156, 959-967.
- Kadar, E., Tschuschke, I G., Checa, A. (2008). Post-capture hyperbaric simulations to study the mechanism of shell regeneration of the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* (Bivalvia: Mytilidae). J Exp Mar Biol Ecol 362, 80-90.
- Kawaguti, S., Ikemoto, N. (1962). Electron microscopy on the mantle of a bivalve, *Musculus senhousia* during regeneration of the shell. Boil J Okayama Univ 8, 31-42.
- Knoll, A. H. (2003). Biomineralization and evolutionary history. Reviews in Mineralogy and Geochemistry 54(1), 329-356.
- Levi, Y., Albeck, S., Brack, A., Weiner, S., Addadi, L. (1998). Control over aragonite crystal nucleation and growth: an in vitro study of biomineralization. Chemistry – A European Journal 4(3), 389-396.
- Levi-Kalishman, Y., Falini, G., Addadi, L., Weiner, S. (2001). Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using cryo-TEM. J Struct Biol 135, 8-17.
- Li, J., Hodgeman, B. A., Christensen, B. M. (1996). Involvement of peroxidase in chorion hardening in *Aedes aegypti*. Insect Biochem Molec Biol 26(3), 309-317.
- Liu, X., Liu, C., Chen, L., Sun, J., Zhou, Y., Li, Q., Zheng, G., Zhang, G., Wang, H., Xie, L., Zhang, R. (2011). A new method to extract matrix proteins directly from the secretion of the mollusk mantle and the role of these proteins in shell biomineralization. Mar Biotechnol 13(5), 981-991.
- Lowenstam, H. A., Weiner, S. (1989). On Biomineralization. Oxford University Press.
- Marie, B., Joubert, C., Tayalé, A., Zanella-Cléon, I., Belliard, C., Piquemal, D., Cochenne-Laureau, N., Marin, F., Gueguen, Y., Montagnani, C. (2012). Different secretory repertoires control the biomineralization processes of prism and nacre deposition of the pearl oyster shell. PNAS 109(51), 20986-20991.

- Marie, B., Le Roy, N., Zanella-Cléon, I., Becchi, M., Marin, F. (2011). Molecular evolution of mollusc shell proteins: insights from proteomic analysis of the edible mussel *Mytilus*. *J Mol Evol* 72(5-6), 531-546.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B., Medakovich, D. (2007). Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Curr Top Dev Biol* 80, 209-276.
- Meenakshi, V. R., Blackwelder, P. L., Wilbur, K. M. (1973). An ultrastructural study of shell regeneration in *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia). *J Zool Lond* 171, 475-484.
- Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T., Matsushiro A. (1996). A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 9657-9660.
- Miyamoto, H., Miyoshi, F., Kohno, J. (2005). The carbonic anhydrase domain protein nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusc *Pinctada fucata*. *Zool Sci* 22(3), 311-315.
- Miyashita, T., Takagi, R., Miyamoto, H., Matsushiro, A. (2002). Identical carbonic anhydrase contributes to nacreous or prismatic layer formation in *Pinctada fucata* (Mollusca: Bivalvia). *The Veliger* 45(3), 250-255.
- Miyashita, T., Okamoto, A., Takagi, R. (2004). Inhibitory effects of carbonic anhydrase nacrein on calcium carbonate crystallization. *Mem School B.O.S.T. Kinki University* 14, 11-16.
- Mount, A. S., Wheeler, A. P., Paradkar, R. P., Snider, D. (2004). Hemocyte-mediated shell mineralization in the Eastern Oyster. *Science* 304, 297-300.
- Nagai, K., Yano, M., Morimoto, K., Miyamoto, H. (2007). Tyrosinase localization in mollusc shells. *Comp Biochem Physiol B* 146, 207-214.
- Owada, M. (2009). Organic sheets in the shells of endolithic mytilids (bivalvia: mytilidae). *Paleontological Research* 13(2), 159-166.
- Owen, G., Trueman, E. R., Yonge, C. M. (1953). The ligament in the lamellibranchia. *Nature* 171, 73-75.
- Philipp, E. E. R., Kraemer, L., Melzner, F., Pouska, A. J., Thieme, S., Findeisen, U., Schreiber, S., Rosenstiel, P. (2012). Massively parallel RNA sequencing identifies a complex immune gene repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLoS ONE* 7(3): e33091. doi:10.1371/journal.pone.0033091.
- Ramos-Silva, P., Kaandrop, J., Huisman, L., Marie, B., Zanella-Cléon, I., Guichard, N., Miller, D. J., Marin, F. (2013). The skeletal proteome of the coral *Acropora millepora*: the evolution of calcification by co-option and domain shuffling. *Mol Biol Evol* 30(9), 2099-2112.
- Saleuddin, A. S. M. (1967). The histochemistry of the mantle during the early stage of shell repair. *Proc malac Soc Lond* 37, 371-380.
- Saleuddin, A. S. M., Petit, H. P. (1983). The mode of formation and the structure of the periostracum. In: *The mollusca*, Vol. 4, *Physiology*, Part 1 (ed. A. S. M. Saleuddin and K. M. Wilbur), pp. 199-234. Academic Press, New York.

- Sarashina, I., Endo, K. (2001). The complete primary structure of molluscan shell protein 1 (MSP-1), an acidic glycoprotein in the shell matrix of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Mar Biotechnol* 3, 362-369.
- Schönitzer, V., Weiss, I. M. (2007). The structure of mollusc larval shells formed in the presence of the chitinase inhibitor Nikkomycin Z. *BMC Structural Biology* 7:71, doi:10.1186/1472-6807-7-7.
- Shi, Y., Yu, C., Gu, Z., Zhan, X., Wang, Y., Wang, A. (2013). Characterization of the pearl oyster (*Pinctada martensii*) mantle transcriptome unravels biomineralization genes. *Mar Biotechnol* 15, 175-187.
- Suzuki, M., Sakuda, S., Nagasawa, H. (2007). Identification of chitin in the prismatic layer of the shell and a chitin synthase gene from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71(7), 1735-1744.
- Suzuki, M., Saruwatari, K., Kogure, T., Yamamoto, Y., Nishimura, T., Kato, T., Nagasawa, H. (2009). An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation. *Science* 325, 1388-1390.
- Takeuchi, T., Endo, K. (2006). Biphasic and dually coordinated expression of the genes encoding major shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Mar Biotechnol* 8(1), 52-61.
- Taylor, J. D., Kennedy, W. J. (1969). The influence of the periostracum on the shell structure of bivalve molluscs. *Calc Tiss Res* 3, 274-283.
- Tsujii, T. (1976). An electron microscopic study of the mantle epithelial cells of *Anodonta* sp. during shell regeneration. The mechanisms of mineralization in invertebrates and plants (ed. N. Watabe and K. M. Wilbur), pp 339-353. Columbia University S. Carol Press.
- Uozumi, S., Suzuki, S. (1979). "Organic membrane-shell" and initial calcification in shell regeneration. *Jour Fac Sci Hokkaido Univ, Ser IV* 19 (1-2), 37-74.
- Vasconcelos, P., Morgado-André, A., Morgado-André, C., Gaspar, M. B. (2011). Shell strength and fishing damage to the smooth clam (*Callista chione*): simulating impacts caused by bivalve dredging. *ICES J Mar Sci* 68(1), 32-42.
- Waite, J. H., Andersen, S. O. (1978). 3,4-Dihydroxyphenylalanine in an insoluble protein of *Mytilus edulis*. *Biochim Biophys Acta* 541, 107-114.
- Waite, J. H., Andersen, S. O. (1980). 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) and sclerotization of periostracum in *Mytilus edulis* L. *Biol Bull* 158, 164-173.
- Waite, J. H., Saleuddin, A. S. M., Andersen, S. O. (1979). Periostracin – a soluble precursor of sclerotized periostracum in *Mytilus edulis* L. *J Comp Physiol* 130, 301-307.
- Waite, J. H., Wilbur, K. M. (1976). Phenoloxidase in the periostracum of the marine bivalve *Modiolus demissus* Dillwyn. *J Exp Zool* 195, 359-368.
- Waite, J. H. (1983). Quinone-tanned scleroproteins. In: *The mollusca*, Vol. 1, Metabolic biochemistry and molecular biomechanics (ed. P. W. Hochachka), pp. 467-504. Academic Press, New York.
- Wang, X., Li, L., Zhu, Y., Du, Y., Song, X., Chen, Y., Huang, R., Que, H., Fang, X., Zhang, G. (2013). Oyster shell proteins originate from multiple organs and their probable transport

pathway to the shell formation front. PLoS ONE 8(6): e66522. doi:10.1371/journal.pone.0066522.

Wang, G.-L., Xu, B., Bai, Z.-Y., Li, J.-L. (2012). Two chitin metabolic enzyme genes from *Hyriopsis cumingii*: cloning, characterization, and potential functions. Genetics and Molecular Research 11(4), 4539-4551.

Weiner, S., Traub, W. (1980). X-ray diffraction study of the insoluble organic matrix of mollusk shells. FEBS letters 111(2), 311-316.

Weiss, I. M. (2010). Jewels in the pearl. ChemBioChem 11, 297-300.

Weiss, I. M., Schönlitzer, V. (2006). The distribution of chitin in larval shells of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*. J Struct Biol 153, 264-277.

Weiss, I. M., Schönlitzer, V., Eichner, N., Sumper, M. (2006). The chitin synthase involved in marine bivalve mollusk shell formation contains a myosin domain. FEBS Letters 580, 1846-1852.

Zhang, C., Li, S., Ma, Z., Xie, L., Zhang, R. (2006). A novel matrix protein p10 from the nacre of pearl oyster (*Pinctada fucata*) and its effects on both CaCO₃ crystal formation and mineralogenic cells. Mar Biotechnol 8(6), 624-633.

Publikation II

Impacts of seawater acidification on mantle gene expression patterns of the Baltic Sea blue mussel: implications for shell formation and energy metabolism

Anne K. Hüning, Frank Melzner, Jörn Thomsen, Magdalena A. Gutowska, Lars Krämer,
Stephan Frickenhaus, Philip Rosenstiel, Hans-Otto Pörtner, Eva E. R. Philipp, Magnus
Lucassen

2013

Marine Biology 160, 1845-1861

DOI 10.1007/s00227-012-1930-9

Mar Biol (2013) 160:1845–1861
DOI 10.1007/s00227-012-1930-9

ORIGINAL PAPER

Impacts of seawater acidification on mantle gene expression patterns of the Baltic Sea blue mussel: implications for shell formation and energy metabolism

Anne K. Hüning · Frank Melzner · Jörn Thomsen · Magdalena A. Gutowska · Lars Krämer · Stephan Frickenhaus · Philip Rosenstiel · Hans-Otto Pörtner · Eva E. R. Philipp · Magnus Lucassen

Received: 21 December 2011 / Accepted: 14 March 2012 / Published online: 8 May 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Marine organisms have to cope with increasing CO₂ partial pressures and decreasing pH in the oceans. We elucidated the impacts of an 8-week acclimation period to four seawater *p*CO₂ treatments (39, 113, 243 and 405 Pa/385, 1,120, 2,400 and 4,000 µatm) on mantle gene expression patterns in the blue mussel *Mytilus edulis* from the Baltic Sea. Based on the *M. edulis* mantle tissue transcriptome, the expression of several genes involved in metabolism, calcification and stress responses was assessed in the outer (marginal and pallial zone) and the inner mantle tissues (central zone) using quantitative real-time PCR. The expression of genes involved in energy and protein metabolism (F-ATPase, hexokinase and elongation factor alpha) was strongly affected by acclimation to moderately elevated CO₂ partial pressures. Expression of a chitinase, potentially important for the calcification process, was strongly depressed (maximum

ninefold), correlating with a linear decrease in shell growth observed in the experimental animals. Interestingly, shell matrix protein candidate genes were less affected by CO₂ in both tissues. A compensatory process toward enhanced shell protection is indicated by a massive increase in the expression of tyrosinase, a gene involved in periostracum formation (maximum 220-fold). Using correlation matrices and a force-directed layout network graph, we were able to uncover possible underlying regulatory networks and the connections between different pathways, thereby providing a molecular basis of observed changes in animal physiology in response to ocean acidification.

Introduction

Ongoing CO₂-induced ocean acidification threatens marine ecosystems (Doney et al. 2009). In the eutrophic Western Baltic Sea, ocean acidification is accompanied by seasonal upwelling of CO₂-enriched water masses, resulting in seawater pH (NBS scale) variability between 8.23 (*p*CO₂: 38 Pa) and 7.49 (*p*CO₂: 234 Pa) (Thomsen et al. 2010). This phenomenon is also well documented from coastal zones and estuarine surface waters (Feely et al. 2010; Waldbusser et al. 2011; Chapman et al. 2011). As additional CO₂ through ocean acidification will greatly increase CO₂ partial pressures in such coastal habitats (see Melzner et al. this special issue), calcifying bivalve reef communities that presently dominate these habitats might be endangered in the future (Thomsen et al. 2010). It is therefore important to understand the mechanisms underlying the impacts of elevated seawater *p*CO₂ and an altered carbonate system speciation on cellular homeostasis and the biomineralization process in ecosystem-engineering species such as the Baltic Sea blue mussel.

Communicated by S. Dupont.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00227-012-1930-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. K. Hüning (✉) · S. Frickenhaus · H.-O. Pörtner · M. Lucassen
Alfred Wegener Institute, Am Handelshafen 12,
27570 Bremerhaven, Germany
e-mail: Anne.Huening@awi.de

F. Melzner · J. Thomsen
Marine Ecology, Helmholtz Centre for Ocean Research
Kiel (GEOMAR), Kiel, Germany

M. A. Gutowska
Marine Biogeochemistry, Helmholtz Centre for Ocean
Research Kiel (GEOMAR), Kiel, Germany

L. Krämer · P. Rosenstiel · E. E. R. Philipp
Institute of Clinical Molecular Biology,
Kiel University, Kiel, Germany

To counteract an extreme acidification of intra- and extracellular fluids, some marine organisms are able to react with metabolic depression (Pörtner et al. 2004). This can be achieved by a decrease in ATP consumption, for example due to down-regulation of protein synthesis (Hand and Hardewig 1996), the reduction in ion exchange rates and the shift to energy efficient transporters in acid–base regulation (Pörtner et al. 2000). Whole-animal metabolic depression, however, has not always been found in mussels of the genus *Mytilus* and in other bivalves. Michaelidis et al. (2005) reported a decline in aerobic metabolism in *Mytilus galloprovincialis* in response to short- and long-term acclimation at a $p\text{CO}_2$ of around 500 Pa, in parallel to an increase in ammonia excretion indicative of enhanced protein catabolism. In the mussel *Mytilus edulis* and the oyster *Crassostrea gigas*, an increase in metabolism was found instead, at seawater $p\text{CO}_2 < 400$ Pa, also alongside a switch toward an increased fraction of protein catabolism, which may balance net proton export (Thomsen and Melzner 2010; Lannig et al. 2010; Beniash et al. 2010). Metabolic depression may set in at higher CO_2 levels as indicated by the hyperbolic response (Thomsen and Melzner 2010). As mussels are not able to regulate extracellular pH (Michaelidis et al. 2005), even under modest hypercapnia (Thomsen et al. 2010; Heinemann et al. 2011), changes in the carbonate system speciation in hemolymph and extrapallial fluid, the fluid in contact with the inner shell surface, are thought to affect the shell-forming process: either through inner shell surface dissolution or due to changes in extra-/intracellular ion composition, which impact cellular homeostasis and intracellular precipitation of amorphous calcium carbonate (Thomsen and Melzner 2010; Mingliang et al. 2011; Melzner et al. 2011). Increases in metabolism at intermediate seawater $p\text{CO}_2$ in bivalves therefore might reflect increased costs for intracellular homeostasis- and biomineralization-related processes.

The mytilid shell consists to 95–99.9 % of CaCO_3 , which is arranged in two polymorphs: an outer layer consisting of calcite (prismatic layer) and an inner layer consisting of aragonite (nacreous layer, mother of pearl). The remainder of shell mass (0.1–5 %) can be attributed to the shell organic matrix, and these are organic molecules that surround the crystals and serve as crystal nucleation and structural templates (Marin et al. 2008; Suzuki et al. 2009). A protective sclerotized proteinaceous layer, the periostracum, is ca. 1–300 μm thick (Harper 1997) and covers the outermost surface of the shell. It serves as a barrier between the shell and seawater (Clark 1976). The periostracum is built from periostracin (Waite et al. 1979), a soluble precursor. To tann this precursor and thus construct an insoluble layer, monophenols of the periostracin are oxidized by tyrosinases (phenoloxidases) to diphenols. In a second step, tyrosinases oxidize the diphenols to quinones (Waite 1983).

Reactions of quinones with nucleophilic amino acids result in cross-links (Andersen 2010). On the proximal face (animal side) of the periostracum, the initial calcium carbonate crystals are attached (Taylor and Kennedy 1969), which potentially gives this layer an important function in initializing the biomineralization process. Recent studies also emphasize that an intact periostracum is crucially important to protect bivalve shells from external shell corrosion during exposure to seawater strongly undersaturated with respect to CaCO_3 (Tunnicliffe et al. 2009; Thomsen et al. 2010).

The current model of nacreous layer formation (Levi-Kalishman et al. 2001) suggests that layers composed of beta chitin enclose a silk-fibroin matrix. Acidic proteins are embedded in this matrix and in contact with the chitin fibrils. These proteins are able to bind Ca^{2+} ions very well due to their acidic character (Ehrlich 2010) and, together with the chitin layers, represent the organic matrix template favoring the nucleation of new CaCO_3 crystals (Suzuki et al. 2009; Weiss 2010). Various matrix proteins also determine which polymorph, that is, calcite or aragonite, is generated (Falini et al. 1996). Today, a number of different matrix proteins are known, and the discovery of new candidates is still in progress.

It has been postulated in the past that spontaneous crystal formation was restricted to the extrapallial space between the mantle tissue and the shell, favored by the super-saturation of Ca^{2+} and HCO_3^- in the extrapallial fluid. Misogianes and Chasteen (1979) disproved this assumption and gave evidence that the extrapallial fluid is undersaturated in respect to calcium carbonate. Thus, recent results suggest that initial formation of amorphous calcium carbonate (ACC) occurs in specialized vesicles of mantle epithelial cells (Weiss et al. 2002; Addadi et al. 2006; Addadi et al. 2008; Jacob et al. 2011). ACC is thought to be released by exocytosis and then incorporated into the growing carbonate structures, a process better understood in echinoderms (Beniash et al. 1999; Politi et al. 2004) than in mollusks. However, if we assume that intracellular ACC formation is the principal first step in shell generation in bivalve mollusks as well, then both calcification and intracellular ion homeostasis are intricately linked: substrate transport for biomineralization (HCO_3^- and Ca^{2+} import, H^+ excretion) will necessarily be dependent on movements of ions required for the maintenance of intracellular pH (HCO_3^- , H^+). Maintenance of stable intracellular pH has been demonstrated for a range of mollusk cell types exposed to hypercapnia (Ellington 1993; Zange et al. 1990; Michaelidis et al. 2005). Part of the surplus energy consumption observed in bivalves exposed to hypercapnia might therefore be due to elevated energetic demands of maintaining intracellular pH and substrate transport for biomineralization in the face of decreased extracellular pH.

For this study, *M. edulis* from the Baltic have been acclimated to four seawater CO₂ partial pressures (39, 113, 243 and 405 Pa/385, 1,120, 2,400 and 4,000 μ atm) for a time period of 8 weeks under optimized feeding conditions. 113 and 243 Pa represent *p*CO₂ levels, which are reached nowadays after upwelling of hypoxic waters in Kiel Bay during summer (Thomsen et al. 2010), and 405 Pa may be the maximum within the next century after hypoxic events (Melnzer et al., this issue). Following incubation, the impact of ocean acidification on gene expression patterns in outer and inner mantle tissues was determined using real-time PCR analysis of selected genes from a recently generated blue mussel transcriptome (Philipp et al. 2012). Genes were chosen with respect to abundance in the mantle transcriptome, tissue specificity or putative functions in calcification, as well as stress response and metabolism (Table 1). Our results provide the molecular basis for the physiological study conducted by Thomsen and Melznzer (2010) as we worked with tissues generated in that experiment. By combining classical expression analyses and correlation network tools (see de la Fuente et al. 2004), our aim was to (1) obtain first insights into which genes might be regulated along with the observed reductions in shell growth under hypercapnia, (2) monitor whether observed changes in metabolic rate and ammonium excretion rate correlate with changes in transcript abundance of genes important for key metabolic pathways and (3) elaborate how metabolic processes and calcification interact on the transcriptional level.

Materials and methods

Animals and water chemistry

Mytilus edulis mantle tissue samples from a previous acclimation experiment (Thomsen and Melznzer 2010) were taken for this investigation. Thirteen mussels (mean shell length of 15 ± 2 mm at the beginning of the experiment and 22.1 ± 0.8 mm after 8 weeks of incubation) were kept in each flow-through aquarium aerated with 39, 113, 243 or 405 Pa (385, 1,120, 2,400 or 4,000 μ atm) CO₂-enriched air for 2 months in each of four replicate tanks with daily monitoring of water chemistry (Table 2), for details see Thomsen and Melznzer (2010). From each aquarium, three mussels were taken for the analyses.

Isolation of total RNA

Inner mantle (central zone) and outer mantle (marginal and pallial) were dissected separately from each mussel, frozen in liquid nitrogen and homogenized with mortar and pestil. Thirty milligrams of the homogenate was used for each single RNA extraction with the RNeasy kit (Qiagen, Hilden,

Germany) following treatment by QIAshredder columns. RNA was dissolved in 0.1 mM EDTA and 10 mM Tris (pH 8.0), concentration was determined photometrically at 260 nm (NanoDrop ND-1000, SeqLab, Erlangen, Germany), and purity was estimated using ratios of 260/280 nm and 260/230 nm. Integrity of the RNA was checked using capillary electrophoresis (Bioanalyzer, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

cDNA library preparation and sequencing analyses

Total RNA per tissue and treatment was pooled [outer mantle: 11 samples (39 Pa) and 12 samples (405 Pa); inner mantle: 12 samples (39 Pa) and 8 samples (405 Pa)] and used for mRNA purification with the Oligotex mRNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany).

cDNA synthesis was performed with the BD SMARTTM PCR cDNA Synthesis kit (BD Bioscience Clontech, Heidelberg, Germany). For first-strand synthesis, 380–560 ng of mRNA was used as template for the SuperScript[®] II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Darmstadt, Germany) in the presence of 2 mM DTT and 0.8 mM dNTP. The second strand was synthesized with the Advantage[®] 2 PCR Enzyme System (BD Bioscience Clontech, Heidelberg, Germany) following the manufacturer's instructions. The amplification cycle was chosen as following: 1 min at 95 °C, 13 \times (15 s at 95 °C, 30 s at 65 °C and 6 min at 68 °C).

Afterward, the PCR products were purified with the QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). The amount of cDNA was estimated photometrically and additionally with an electrophoretic separation in an agarose gel. Three to five micrograms of the double-stranded cDNA was taken for the pyrosequencing by the Genome Sequencer FLX system (454 Life Science, Branford, CT, USA) following the manufacturer's instructions. The procedure of EST assembly and annotation is described elsewhere (Philipp et al. 2012). The gene sequences used in the present study were submitted as transcriptome shotgun assembly (TSA) in the European Nucleotide Archive (EMBL).

Quantitative real-time PCR

Three micrograms of total RNA per sample was used for DNA digestion with the TURBO DNA-free Kit (Ambion, Darmstadt, Germany). cDNA synthesis was conducted with 0.4 μ g of DNA-free RNA with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Primers (Table 3) were designed with the Primer Express[®] Software for Real-time PCR (version 3.0, Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) using the TaqMan MGB Quantification method under default settings. PCR was conducted with the 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) and SYBR

Table 1 Number of reads per million sequenced reads per contig of inner (IM) and outer (MR) mantle tissues deduced from the mantle transcriptome

Gene	Name	Contig no.	EMBL accession no.	Reads per million (IM)	Reads per million (MR)
18S	18S ribosomal RNA	53141	HE662843	289	255
AMT	Aminomethyltransferase	2875	HE662822	58	7
AspAT	Aspartate aminotransferase	48361	HE662841	87	60
CA	Carbonic anhydrase	49923	HE662842	29	47
CHI	Chitinase	3920	HE662827	2,650	1,153
CHS	Chitin synthase	64848	HE662847	35	181
CNN	Calponin-like protein	5049	HE662833	139	1,307
CSP	Circumsporozoite-like protein	4338	HE662831	330	3,398
DBP4	RNA helicase DBP4	15981	HE662836	127	147
EFalpha	Elongation factor alpha	3946	HE662828	5,057	3,351
FF1a	ATP synthase subunit alpha	4669	HE662832	2,604	925
FF1g	ATP synthase subunit gamma	8392	HE662835	1,209	409
FFOc	ATP synthase subunit c	2453	HE662820	1,007	469
GDH	Glutamate dehydrogenase	56787	HE662845	35	20
HIP	Heavy metal-binding protein	2498	HE609393	7,614	20,165
HK	Hexokinase	4196	HE662830	93	147
IDH	Isocitrate dehydrogenase	4038	HE662829	891	1,548
MPEROX	Melanogenic peroxidase	58942	HE662846	0	831
MUC	Mucin	17587	HE662837	0	630
MYTB	Mytilin B	2277	HE609175	897	2,104
MYTD	Mytilin D	8403	HE609179	122	563
NACR	Nacrein-like protein	39557	HE662840	0	1,267
NKA	Na ⁺ /K ⁺ ATPase subunit alpha	35754	HE662838	527	436
PK	Pyruvate kinase	54094	HE662844	370	161
PLUC	Perlucin-like protein	3175	HE662824	0	181
PMCA	Plasma membrane Ca ²⁺ ATPase	73745	HE662849	35	27
PRX	Peroxisome oxidin 6	3013	HE662823	602	576
PWAP	Perlwapin-like protein	3428	HE662826	1,499	529
SCaP	Sarcoplasmic Ca ²⁺ -binding protein	7391	HE662834	399	489
SDH	Succinate dehydrogenase	73275	HE662848	191	154
SILK	Silk-like protein	2413	HE662819	0	1,206
SPARC	SPARC	38705	HE662839	41	436
TYR1	Tyrosinase	2527	HE662821	41	13
TYR2	Tyrosinase	3233	HE662825	0	4,691

Listed contigs were used for detailed real-time PCR analysis; sequences are available under the respective accession number at EMBL

Table 2 Carbonate system parameters including $p\text{CO}_2$, pH, total alkalinity (A_T), total dissolved inorganic carbonate (C_T), saturation state of calcite and aragonite (Ω_{ca} and Ω_{ar}) during the 8-week incubation with values of the mean and their corresponding standard deviations, from Thomsen and Melzner (2010)

$p\text{CO}_2$ treatment (Pa)	pH_{NBS}	A_T ($\mu\text{mol/kg}$)	C_T ($\mu\text{mol/kg}$)	$p\text{CO}_2$ (Pa)	Ω_{ca}	Ω_{ar}
39	8.03 ± 0.04	$2,044.6 \pm 52.4$	$1,968.9 \pm 21.7$	47.8 ± 5.3	1.86 ± 0.20	1.11 ± 0.12
113	7.70 ± 0.04	$2,040.7 \pm 23.4$	$2,031.1 \pm 27.3$	92.2 ± 6.9	1.02 ± 0.06	0.61 ± 0.04
243	7.38 ± 0.06	$2,051.0 \pm 29.2$	$2,124.1 \pm 13.9$	204.3 ± 26.6	0.50 ± 0.07	0.30 ± 0.04
405	7.14 ± 0.08	$2,044.3 \pm 22.2$	$2,213.9 \pm 26.7$	377.8 ± 24.1	0.27 ± 0.02	0.16 ± 0.01

Table 3 Primer data for the genes studied using real-time PCR including primer name, gene/protein description, primer sequences, efficiency and accession number of appropriate BLAST match

Primer name	Gene/protein description	Primer sequence	Efficiency	Accession no.
18S_for	18S ribosomal RNA	CCGGCGACGTATCTTTCAA	1.91	AY527062.1
18S_rev		AGGCATATCACGTACCATCGAA		
AMT_for	Aminomethyltransferase	ATCTGCTGGTAAGGTGATGCAA	1.97	CAP19396.1
AMT_rev		TGTCATGAATGGCAAAGTGTTCA		
AspAT_for	Aspartate aminotransferase	ACCGGAGTGATCCAACAAA	1.99	AAU21290.1
AspAT_rev		TGTTTTTAGCCTGGCAGGTCTT		
CA_for	Carbonic anhydrase	CAAGCACTGCGTAACCTGAAAT	1.88	AAV97962.1
CA_rev		GGTACAGGTGGCCTATAGTTGTCTACT		
CHI_for	Chitinase	GTGCTATGTTCTGGGCTCTTGA	1.88	AJ971239.1
CHI_rev		AATCGCCTTCATGACATGCA		
CHS_for	Chitin synthase	CAAAGACGTCGATGGTCTCCTT	2.00	ABQ08059.1
CHS_rev		CGCCATGAAGCTAACAAATCC		
CNN_for	Calponin-like protein	AGCCCTGATATCGGCTATGTGT	1.82	AB052656.1
CNN_rev		GATTTCGCTAGCCAAAAGGGAAT		
CSP_for	Circumsporozoite-like protein	TCAGTTCCGAGAGTTCTGTATGGT	1.82	HQ011313.1
CSP_rev		AGCTACTAGAACTCTGTCCACCGTGTA		
DBP4_for	RNA helicase DBP4	GGACTGCCCTGAAGATGCTAA	1.87	XM_002430517.1
DBP4_rev		TCCCTTCTCATACCTTGCTGTTT		
EFalpha_for	Elongation factor alpha	TGGGAAAAGGCTCCTTCAAGT	1.90	AB162021.1
EFalpha_rev		CACGCTCTGCCTTCAGTTTG		
FF1a_for	ATP synthase subunit alpha	GGTCTTAAAAACATCCAGGCAGAA	1.94	DQ986328.1
FF1a_rev		GCCATGCCCTTCAATCCA		
FF1g_for	ATP synthase subunit gamma	TCAACCGAACACGAATTTCTT	1.84	ACO12344.1
FF1g_rev		TCCCACAATGCACGCAAGT		
FFOc_for	ATP synthase subunit c	GGTGCTACCTCTGGTTTGTG	1.86	ABY87376.1
FFOc_rev		CGCGTCTAGCCAGACCTTT		
GDH_for	Glutamate dehydrogenase	TTGGTAAACAAGGTGGAACATTCC	1.84	NM_001011138.1
GDH_rev		GCACCAGATATTTCTTTTTCGAACT		
HIP_for	Heavy metal-binding protein	TCACCACGTGGCATTCTCTG	1.84	AJ609591.1
HIP_rev		CTCTTCAGCACCAAGGTTTCA		
HK_for	Hexokinase	CCCATGTAAACAAGAAGGACTAGC	1.85	AM076954.1
HK_rev		CCCTCACATCTGAATCCTTTTGTC		
IDH_for	Isocitrate dehydrogenase	ACGGTACAGTAACCCGTCATTACA	1.86	AY551096.1
IDH_rev		CAGGGTTGGTGCTGGTAGGA		
MPEROX_for	Melanogenic peroxidase	GATCAGAATCAGCGCCTTACAA	1.85	CAA72331.1
MPEROX_rev		CGATGTGGCCTGGTTCATCT		
MUC_for	Mucin	CAATGTGCGGTGCTTCCA	1.90	L02115.1
MUC_rev		CCTCATATGTTTCTCGGGAAA		
MYTB_for	Mytilin B	CATGAGGCAGAGGCAAGTTG	1.85	AF162336.1
MYTB_rev		CCACAGCGTCTTGCTCTACAAT		
MYTD_for	Mytilin D	GTTGGGCATCAGCCAGTTT	1.88	EU810204.1
MYTD_rev		CACTGCCACAACGGAAACAT		
NACR_for	Nacrein-like protein	ACAACAATTTATGTGAAGGACCAGAT	1.93	P86856.1
NACR_rev		CGCAGGTCGTCCAACATG		
NKA_for	Na ⁺ /K ⁺ ATPase subunit alpha	TGGACGACAACCTCAGGGAAT	2.00	ABO61332.1
NKA_rev		AAACTCTTTCTCCAAGACCTCCTAATT		

Table 3 continued

Primer name	Gene/protein description	Primer sequence	Efficiency	Accession no.
PK_for	Pyruvate kinase	GGCAGGCACAACAGCTACAG	1.81	AM076953.1
PK_rev		CCAGTTTACATATGTGCTCCAAGTG		
PLUC_for	Perlucin-like protein	TGCGGAGGTAGAGTGTGCGAA	1.90	P86854.1
PLUC_rev		TTCCGCAAAATCAGTGACTTGT		
PMCA_for	Plasma membrane Ca ²⁺ ATPase	CGGAGGTGATGGGAGTGATT	1.84	EF121960.1
PMCA_rev		TCCTAAAATTGCTACTCCTTCTATCCA		
PRX_for	Peroxiredoxin 6	CCAGCTAATTGGAAGCAAGGA	1.88	ACF35639.1
PRX_rev		GCTGCCCTCTTCTGGTGTAACT		
PWAP_for	Perlwapin-like protein	CCAAAAACAATGTCCATCAGGAT	1.85	P86855.1
PWAP_rev		GTGACTGCTGCACATCGTCTATT		
SCaP_for	Sarcoplasmic Ca ²⁺ -binding protein	TTGAAGGCCTAAGCAAATCTAAGG	1.85	BAA75225.1
SCaP_rev		TCTCCACCATGCTCCTATTTT		
SDH_for	Succinate dehydrogenase	CAGCTGTTCTCATGCAGGCATA	1.95	ACO09839.1
SDH_rev		GCCAACCTTTCATTTGTAAAATCA		
SILK_for	Silk-like protein	TGGTCCATGCGATCCAAAT	1.91	AF218621.1
SILK_rev		ACCATTGCCTGGACCAACAT		
SPARC_for	SPARC	ACCACTGCAACGCAATGAAC	1.87	AB600273.1
SPARC_rev		TTCTCCACGGCCACATCTCT		
TYR1_for	Tyrosinase	GCCCCACCCTGATGCAT	2.02	AAZ66340.1
TYR1_rev		AAGTCGGTCTCACCCAACAAA		
TYR2_for	Tyrosinase	CCCTTCTGGCCAGTTTGTGAC	1.92	AAZ66340.1
TYR2_rev		AAGGCAGCAAGTAAAAGCTGGTA		

Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Efficiency curves were estimated by choosing five different dilutions of template cDNA ranging from 2 ng to 0.04 ng to ensure optimal PCR conditions. The estimated efficiencies ($10^{-(1/\text{slope})}$) ranged between 1.81 and 2.02 (mean: 1.9 ± 0.06 ; Table 3). MYTD, PMCA and CA were amplified with 900 nM of each primer, and all other reactions were conducted with 300 nM of primer. CHI, CNN and HIP were amplified with 0.2 ng of template cDNA, 18S rRNA was amplified with 0.02 ng, and all other genes were amplified with 2 ng of template, to reach comparable threshold cycles. Melting curves were determined for each assay to verify the specific amplification of fragments.

Gene expression differences were analyzed using the ddC_T method. The expression was normalized using 18S rRNA, as its expression was similar in both tissues, and was estimated as stable housekeeper (relative expression stability of $M = 0.581$; M should be ≤ 1.5 for controls) using geNorm (version 3.5, release of 2007 as freeware). Log 2 fold-changes were calculated in comparison with the control (outer mantle, 39 Pa).

Statistical analysis

Significant changes (Table 4) in gene expression were determined by one-way ANOVA for each tissue type sepa-

ately, followed by Student–Newman–Keuls test ($\alpha < 0.05$) as post hoc test using SigmaStat (version 3.5, Systat Software, Erkrath, Germany). The post hoc test was only conducted when the data were normally distributed ($p > 0.05$), and homogeneity of variance ($p > 0.05$) was given. Nalimov's test (Zanker 1984) was used to identify technical outliers. The final mean numbers of individuals per group and gene varied between $n = 9$ –10 (outer mantle, 39 Pa), $n = 10$ –11 (outer mantle, 113 Pa), $n = 10$ –11 (outer mantle, 243 Pa) $n = 11$ –12 (outer mantle, 405 Pa), $n = 9$ –10 (inner mantle, 39 Pa), $n = 9$ –10 (inner mantle, 113 Pa), $n = 11$ –12 (inner mantle, 243 Pa) and $n = 7$ –8 (inner mantle, 405 Pa).

Pairwise Spearman's correlations of relative gene expression values were estimated for complete observations. The resulting correlation matrix was used to calculate a network with lower absolute correlation cutoff 0.5 in R (R Development Core Team 2011). The R-script including data is available at <http://www.awi.de/en/go/bioinformatics> (CorNet). Graphs illustrating the relative expression values (Figs. 1, 2) were generated using SigmaPlot (version 9, Systat Software). Correlation networks (largest correlation networks, Fig. 3; Fig. 1 supplement) using a force-directed layout were drawn from within the R-script and manually finished in color, typesetting and gene-group legend. Alignments and the phylogenetic tree (Figs. 2, 3 supplement) were constructed using MacVector (version 10, Cary, USA).

Table 4 One-way ANOVA and post hoc test results (Student–Newman–Keuls, $\alpha = 0.05$) for inner mantle (IM) and outer mantle (MR) for all combinations of the 4 CO₂ treatments

ANOVA			$p\text{CO}_2$ (Pa)					
			39/113	39/243	39/405	113/243	113/405	243/405
Gene _{tissue}	<i>F</i>	<i>p</i>	Post hoc					
			<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
CHI _{MR}	3.496	0.024			0.015			
CNN _{IM}	7.996	<0.001	0.001	0.002			0.021	0.025
CNN _{MR}	7.610	<0.001	0.006	0.003			0.006	0.004
EFalpha _{IM}	4.278	0.011					0.030	0.016
FFOc _{MR}	6.775	<0.001	0.011	0.006			0.010	0.004
FF1g _{MR}	11.775	<0.001	<0.001	<0.001			<0.001	0.001
HK _{MR}	4.007	0.014	0.015	0.017	0.020			
MPEROX _{MR}	6.894	<0.001			0.029		0.001	0.002
TYR1 _{IM}	7.261	<0.001		0.034	<0.001		0.005	0.037
TYR1 _{MR}	11.436	<0.001			<0.001		<0.001	<0.001

Results

In this study, gene expression patterns from outer and inner mantle tissue were compared in animals acclimated for 8 weeks to four different CO₂ partial pressures. Thirty-three genes of interest were selected from a transcriptome from pooled mRNA of blue mussel tissues (Philipp et al. 2012). The transcriptome was screened for transcripts highly and specifically expressed in the mantle and for transcripts putatively involved in biomineralization, metabolism, cell/ion homeostasis, cellular stress response and RNA metabolism.

Calcification and periostracum formation

The gene expression of a tyrosinase (TYR1) was significantly increased in the outer and inner mantles in a dose-dependent manner and showed equal transcript levels in both tissues. The expression was elevated 75-fold and 220-fold from control to high hypercapnic conditions in the outer and in the inner mantles, respectively (Fig. 1a). However, TYR2, an outer mantle-specific isoform that was found to be highly expressed in the mantle transcriptome (Table 1) was not influenced by hypercapnia (Fig. 1b). Transcript levels of a heavy metal-binding protein of the extrapallial fluid (HIP), which has a potential function in Ca²⁺ binding (Yin et al. 2005; Hattan et al. 2001), were not significantly altered by CO₂ treatment (Fig. 1c). On the contrary, expression of a highly expressed chitinase (CHI) decreased linearly with increasing hypercapnia, in the outer mantle significantly ninefold and in the inner mantle sevenfold (Fig. 1d). Chitin synthase (CHS) gene expression was not affected by CO₂ treatment (Fig. 1e).

A plasma membrane Ca²⁺ ATPase (PMCA) was constantly expressed in both tissues over the four applied $p\text{CO}_2$

levels (Fig. 1f). The expression of a sarcoplasmic Ca²⁺-binding protein (SCaP) was not influenced by hypercapnia (Fig. 1g). However, the expression of mRNA coding for another Ca²⁺-binding protein, calponin (CNN), was significantly reduced threefold at 113 and 243 Pa in the outer and inner mantle tissue (Fig. 1h). For CNN, high $p\text{CO}_2$ led to an expression comparable to control conditions. The expression of a carbonic anhydrase isoform (CA), which catalyzes the interconversion of bicarbonate and CO₂, was not significantly affected by hypercapnia (Fig. 1i). Most of the matrix protein candidate genes were predominately expressed in the outer mantle (Fig. 1j–q), with the transcript abundance in the inner mantle being 250-fold up to 4,700-fold lower compared to the outer mantle tissue (MUC, PLUC, NACR, MPEROX and SILK). Transcripts coding for circumsporozoite-like protein (CSP), as well as secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), were expressed only 5 times less in the inner mantle (Fig. 1n, o). Perlwapin-like protein (PWAP) (Fig. 1p) was the only matrix protein candidate gene in the data set with a higher expression in the inner mantle (threefold higher than in the outer mantle). Interestingly, a significant change in expression of genes potentially relevant for calcification was only obvious in the melanogenic peroxidase (MPEROX) in the outer mantle, where the amount of transcript decreased 1.7 times in comparison with the control (Fig. 1k). For the remaining matrix protein candidate genes, no $p\text{CO}_2$ -dependent expression could be demonstrated (Fig. 1j, l–q).

Metabolism, cell/ion homeostasis and stress response

The expression of the ATP synthase subunits F₁ alpha, gamma and F₀ c (FF1a, FF1g and FFOc) (Fig. 2a–c) was consistently regulated in both tissues, with a significant decrease by a factor of about 1.5 in the outer mantle at 113

Fig. 1 Expression levels of several candidate genes potentially involved in calcification. Mean values are given with their corresponding standard errors. *Filled circles* outer mantle, *open circles* inner mantle; Significant changes (post hoc test) in expression are denoted with *small letters* for the outer mantle and with *capital letters* for the inner mantle tissue. Gene names are as follows: *TYR* tyrosinase, *HIP* heavy metal-binding protein, *CHI* chitinase, *CHS* chitin synthase, *PMCA*: plasma membrane Ca^{2+} ATPase, *SCaP*: sarcoplasmic Ca^{2+} -binding protein, *CNN* calponin-like protein, *CA* carbonic anhydrase, *NACR* nacrein-like protein, *MPEROX* melanogenic peroxidase, *SILK* silk-like protein, *PLUC* perlucin-like protein, *CSP* circumsporozoite-like protein, *SPARC* secreted protein acidic and rich in cysteine, *PWAP* perlwapin-like protein, *MUC* mucin

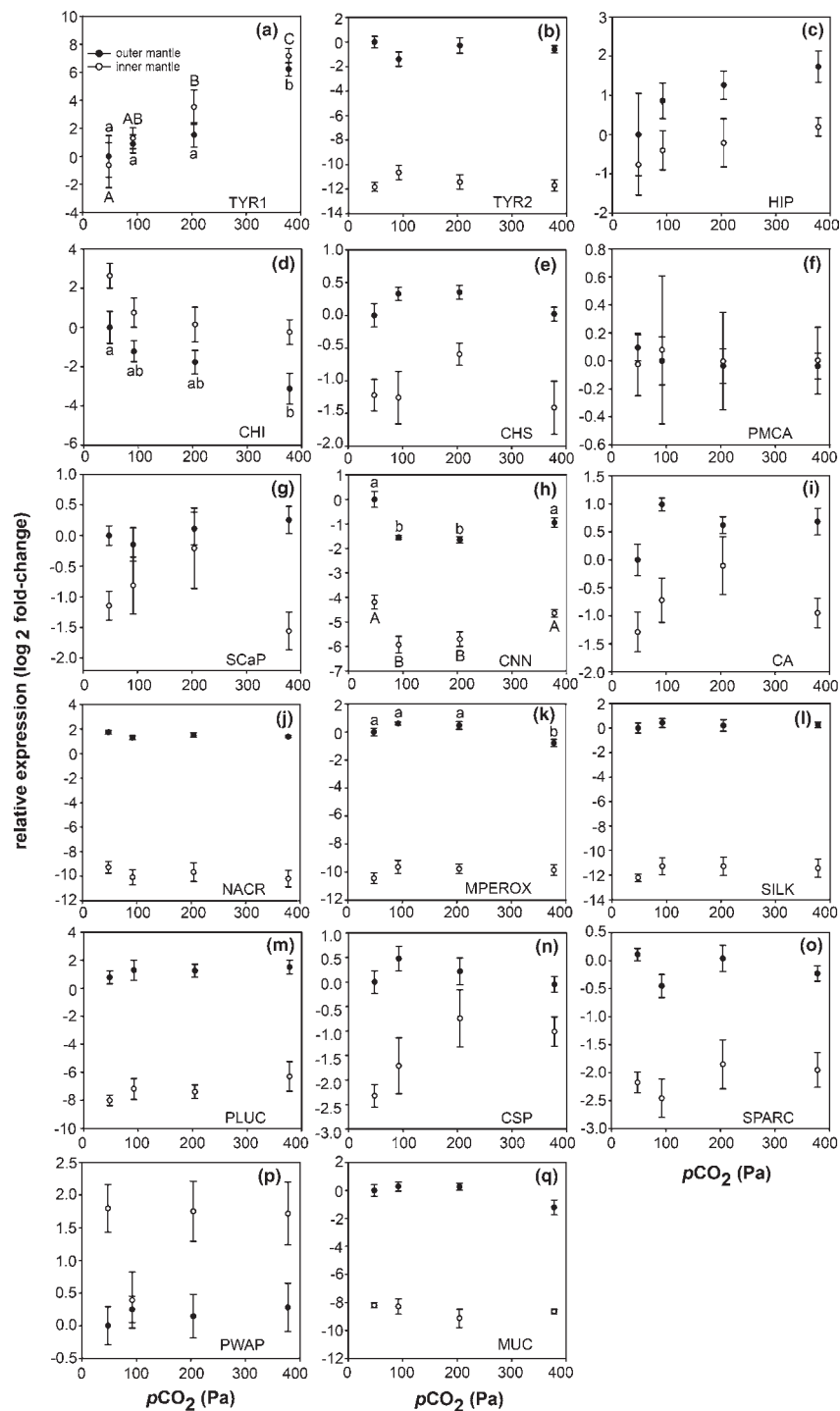


Fig. 2 Expression levels of several candidate genes involved in metabolism and stress response. Mean values are given with their corresponding standard errors. Filled circles outer mantle, open circles inner mantle; Significant changes (post hoc test) in expression are denoted with small letters for the outer mantle and with capital letters for the inner mantle tissue. Gene names are as follows: *FF1a* ATP synthase subunit alpha, *FF1g* ATP synthase subunit gamma, *FFOc* ATP synthase subunit c, *SDH* succinate dehydrogenase, *PK* pyruvate kinase, *HK* hexokinase, *AMT* aminomethyltransferase, *GDH* glutamate dehydrogenase, *AspAT* aspartate aminotransferase, *EFalpha* elongation factor alpha, *DBP4* RNA helicase DBP4, *NKA* Na⁺/K⁺ ATPase subunit alpha, *MYTB* mytilin B, *MYTD* mytilin D, *PRX* peroxiredoxin 6

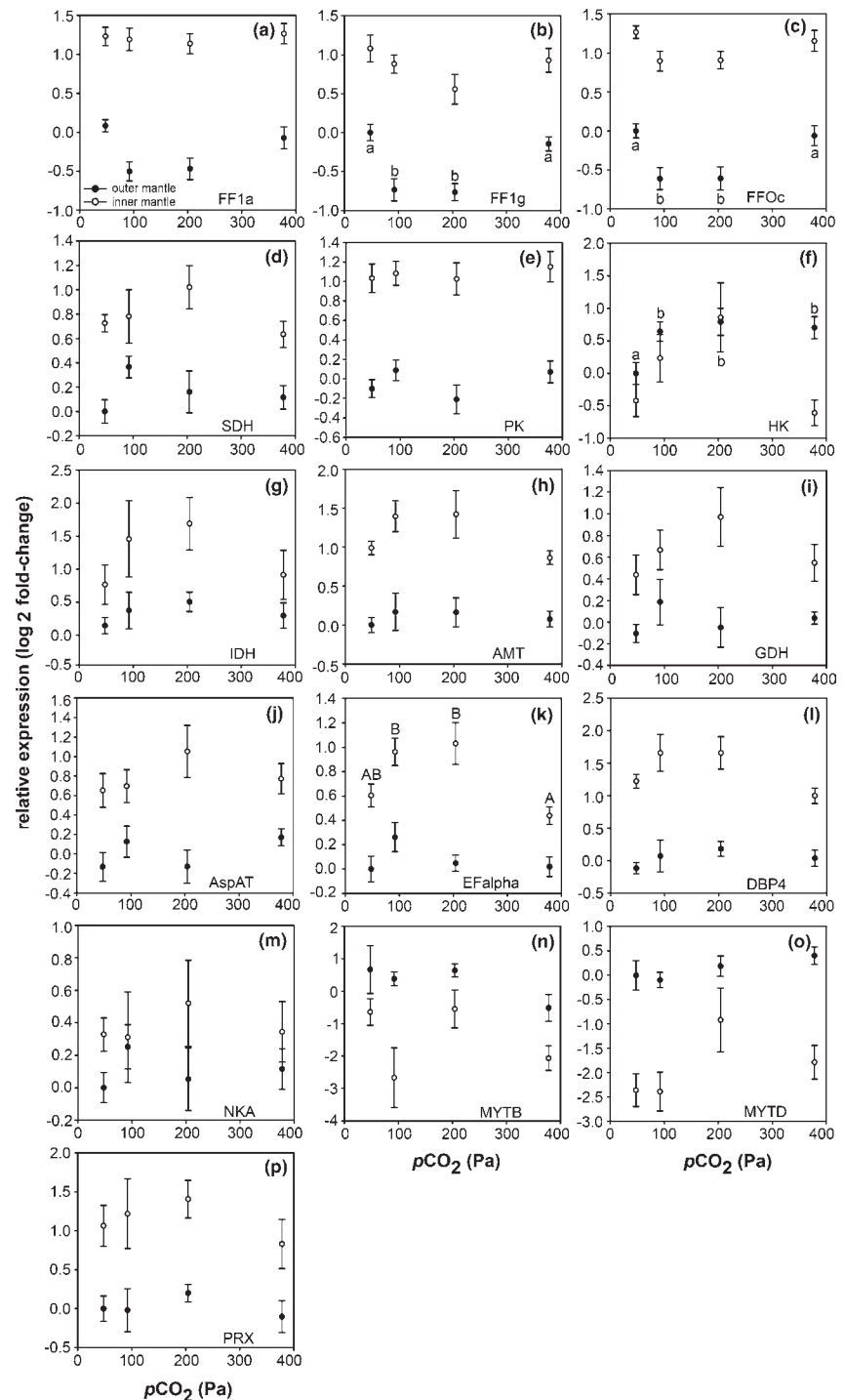
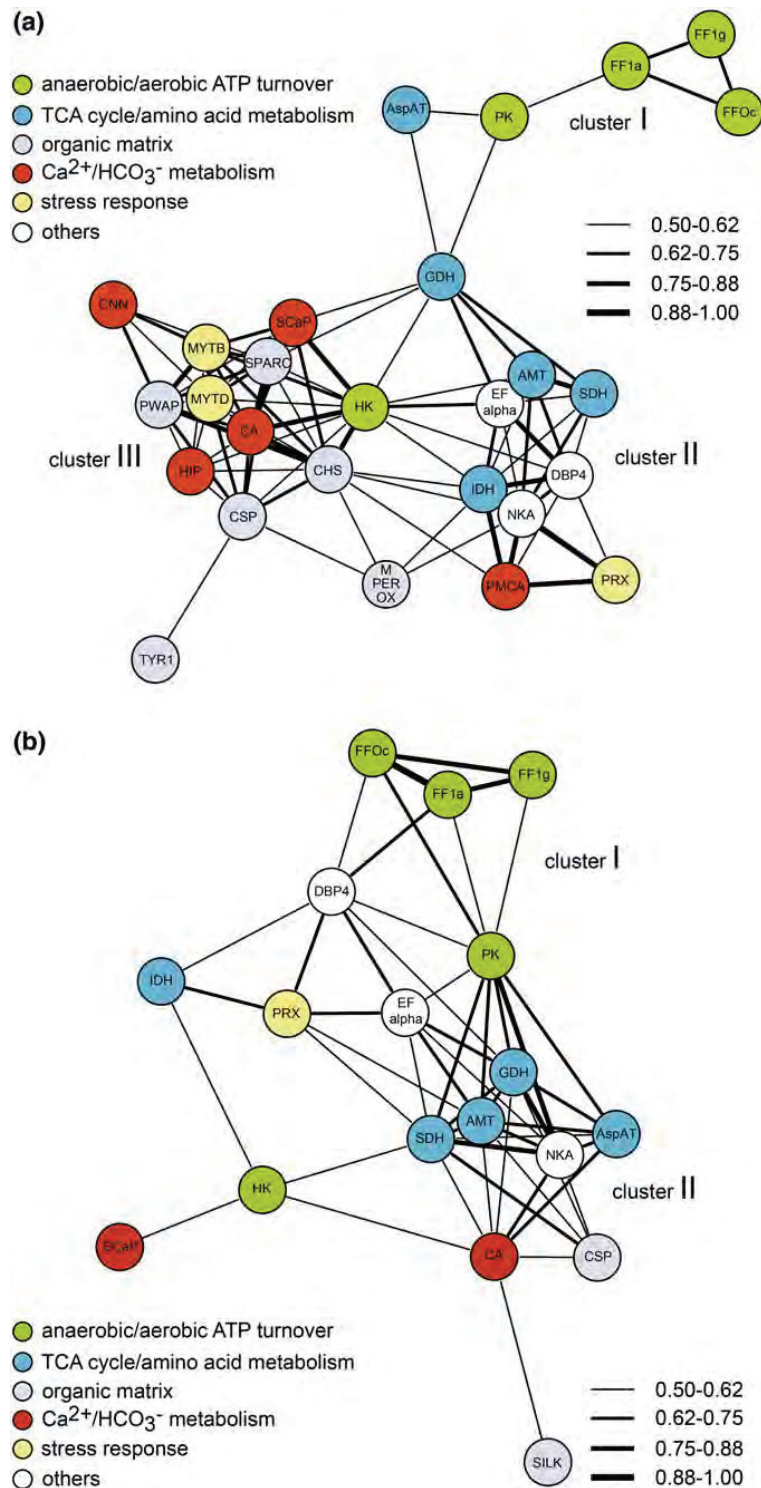


Fig. 3 Correlation network of genes in **a** inner mantle tissue and **b** outer mantle tissue based on the R-script. Line width of vertices corresponds to correlation. Genes are set as correlated when Spearman's $\rho \geq 0.5$



and 243 Pa (FF1g, FFOc). Incubation with 405 Pa CO₂ resulted in expression levels indistinguishable from control conditions. The quantified subunits were consistently expressed 2- to 2.5-fold higher in the inner mantle than in the outer part. The expression pattern of succinate dehydrogenase (SDH) (Fig. 2d) suggested an inverse pattern, with increased expression at intermediate pCO₂. However, this trend was not significant.

Pyruvate kinase (PK) expression was not significantly affected by hypercapnia (Fig. 2e), but hexokinase (HK) expression was elevated significantly under all hypercapnic incubations in the outer mantle compared to control conditions (Fig. 2f). Isocitrate dehydrogenase (IDH) expression followed a similar nonsignificant trend as SDH (Fig. 2g). Similar expression patterns could be detected in an aminomethyltransferase (AMT) (Fig. 2h) and glutamate dehydrogenase (GDH) (Fig. 2i). The expression of aspartate aminotransferase (AspAT) (Fig. 2j) was not altered by hypercapnia. Elongation factor alpha (EFalpha) expression was significantly altered by pCO₂ in the inner mantle tissue, again following a hyperbolic curve (Fig. 2k). Due to high individual variability, no significant change could be assessed in the gene expression of the RNA helicase DBP4, a protein involved in ribosome biogenesis (Jankowsky 2011) (Fig. 2l).

Expression of Na⁺/K⁺ ATPase (NKA), the main driver of many secondary active ion transporters, was not significantly modified under hypercapnia. As in several other transcripts studied, variability between replicates was reasonably high (Fig. 2m).

The mRNA expression of two antibacterial peptides, mytilin B (MYTB) and mytilin D (MYTD), as well as that of redox protein peroxiredoxin 6 (PRX) was assessed as an indicator for cellular stress responses (Fig. 2n–p). No significant changes in expression were found for these genes. It is worth mentioning, however, that mytilins were expressed at higher levels in the outer mantle (doubled for MYTB and 5-times for MYTD), while PRX transcript abundance was doubled in the inner mantle tissue.

Correlation network of the investigated genes

From pairwise correlations of gene expression values per tissue, network plots were generated (Fig. 3a, b) to uncover dominating possible interactions between the various genes and pathways investigated, as most genes showed individual variability and no clear hypercapnia effect. In the inner mantle tissue (Fig. 3a), genes are mainly clustered in three distinct groups. The F-ATPase subunits are strongly correlated with each other and cluster together with PK (cluster I). The second cluster (II) is represented by genes coding for TCA cycle and amino acid metabolism together with genes coding for translational initiation (EFalpha) and

RNA metabolism (DBP4). Interestingly, the NKA is strongly correlated within this cluster, as well as PRX, coding for oxidative protection mechanism. The third cluster is mainly generated by connections between genes responsible for organic shell matrix (CSP, SPARC, CHS, PWAP, TYR1, MPEROX) and genes responsible for the inorganic shell component CaCO₃ (CA, SCAp, CNN, HIP). This cluster also contains genes coding for immune responses (MYTB, D). Clusters II and III are mainly connected via HK, CHS and EFalpha, IDH and GDH by several correlations, whereas the connection of cluster I to cluster II is via PK.

The arrangement of the genes in the outer mantle tissue (Fig. 3b) followed a similar pattern with respect to clusters I and II, but the connection via PK is stronger through several correlations to cluster II. Cluster II contains the same genes but is somewhat more relaxed compared to the inner mantle. SILK and CSP, but also SCAp functioning in Ca²⁺ binding and transporting are correlated with cluster II.

Furthermore, the prevalent features of the networks are not induced by pCO₂, as can be seen in partial correlation networks, that is, computing correlations after removing pCO₂ correlations (Fig. 1a/b supplement; data and script given in the software). It is noteworthy that the connection of cluster III in Fig. 3a is strengthened by pCO₂ illustrated by several connections with cluster II.

Discussion

Previously, Thomsen and Melzner (2010) demonstrated reduced shell growth and enhanced NH₄⁺ excretion rate with increasing pCO₂ in the specimens used in the present study. Since increased metabolic rates were found under moderate hypercapnia, global metabolic depression causing reduced shell growth can be excluded, but adjustments in energy and protein metabolism may be postulated. Here, we monitored the underlying expression patterns of genes potentially involved in these processes and uncovered a complexity of responses and correlations using distinctive mathematical tools (Figs. 1, 2, 3).

Calcification and periostracum synthesis

A significant reduction in chitinase (CHI) transcript level could be documented in the outer mantle tissue. CHI was identified to be one of the most abundant mantle-specific transcripts in *Mytilus edulis*, both in the outer and in the inner mantle regions (Table 1; Melzner, Hüning et al. unpublished). Chitinases catalyze the degradation of chitin polymers (Kramer and Muthukrishnan 2005). As chitin is the primary component of the organic template for coordinated crystal formation in bivalves (Falini et al. 2003;

Weiss and Schönlitzer 2006; Schönlitzer and Weiss 2007; Suzuki et al. 2007), an abundance of chitin is essential for calcification. For example, two matrix proteins (Pif 97 and Nautilin-63) directly bind to chitin, promoting the biomineralization process of the aragonitic layer (Suzuki et al. 2009; Marie et al. 2011a). Recently, yet another matrix protein containing a chitin-binding region was detected in *Mytilus californianus* (Marie et al. 2011b). When chitin polymerization was inhibited using diflubenzuron, crystal layers were shown to be disordered in the freshwater clam *Anodonta cygnea* (Machado et al. 1990). Chitin polymer synthesis is likely dependent on perfectly organized interaction of chitin formation and degradation. In insects, precisely coordinated chitin synthesis and cleavage is essential for larval molt and pupation (Merzendorfer and Zimoch 2003). Although there are no reports on chitinases as regulators of the biomineralization process in bivalves until now, its high abundance of transcripts in both tissues and the strong, linear CO₂-dependent regulation in gene expression that coincides with linear decreases in calcification observed in the same experimental animals (see Thomsen and Melzner 2010, Fig. 2b) supports this assumption. Since no change in CHS expression was detectable, the decrease in chitinase potentially indicates an adjustment of the chitin formation/degradation cycle toward an enhanced rate of chitin retention. Such an adjustment could save energy under conditions of higher chitin demand. Clearly, more research is needed on chitin metabolism in relation to shell formation in order to clarify the significance of the strong changes in expression observed.

No significant changes were detected in the expression of the majority of shell matrix protein candidate genes chosen from the transcriptome (SILK, NACR, PLUC, CSP, SPARC, PWAP, MUC). As Thomsen and Melzner (2010) measured a maximum reduction in shell mass of about 20 % as well as a reduction in shell growth of 30 % in comparison with the control group at the highest CO₂ treatment level, it is quite likely that the very high degree of interindividual variation in matrix proteins (coefficient of variation (CV) between 20 and 175 %) obscured minor changes in expression. Production of organic matrix in the shell is a cost-intensive process, as 29 Joule per mg organic matrix is invested in comparison with only 1–2 Joule per mg CaCO₃ (Palmer 1983, Palmer 1992). It appears that under conditions of high-energy supply and at relatively moderate water temperatures (around 10 °C) in this experiment (see Thomsen and Melzner 2010 for details), matrix protein RNA synthesis is maintained at high levels. Under food-limited conditions and at low temperatures, corrosion of the inner shell surface with elevated seawater pCO₂ has recently been demonstrated (Melzner et al. 2011). This is due to the inner shell surface being in contact with an extracellular fluid that is highly undersaturated with calcium car-

bonate even under control conditions, but much more so when seawater pCO₂ is elevated (Thomsen et al. 2010; Heinemann et al. 2011). As inner shell surface corrosion intensity was found to be dependent on food supply (Melzner et al. 2011), it is likely that energy-demanding mechanisms are essential for preserving shell integrity, possibly involving organic coatings. Synthesis of expensive organic matrix components (Palmer 1992) could therefore be one of the first processes to be sacrificed during CO₂ stress under energy limitation.

For calcification, Ca²⁺ ions must be transported from the seawater to the biomineralization site. Inorganic carbon and calcium are transported into epithelial cells (via ion transporters and channels) and further into ACC-forming vesicles (Weiner and Addadi 2011). Yet, this process is functionally not characterized in mollusks. It is possible that a Ca²⁺ ATPase is involved in transporting Ca²⁺ ions into the ACC-forming vesicles, thus elevating the intravesicular Ca²⁺ concentration. However, we could show that CO₂ treatment did not alter the expression level of the chosen Ca²⁺ ATPase isoform. Additionally, other calcium-binding proteins might support the calcification process, uptake or release of calcium ions. Two Ca²⁺-binding proteins (calmodulin and one similar to calphotin) have already been localized in mantle cells of *Pinctada fucata* and the prawn *Penaeus japonicus*, suggesting they have a function in the biomineralization process (Li et al. 2004; Endo et al. 2000). However, evidence of the involvement of Ca²⁺-binding proteins in shell formation and their precise localization is still missing. Under moderately elevated pCO₂, the expression of CNN was reduced by a factor of 3. In vertebrates, the influence of calponin on bone formation is evident: mice deficient in the calponin gene suffered from enhanced bone formation, suggesting that this protein has a suppressing function on bone synthesis (Yotsumoto et al. 2010). Similarly, we speculate that in *M. edulis*, a reduced CNN expression under moderate CO₂ could be the part of a reduced inhibition of the calcification process.

The periostracum, the organic cover of the mytilid shell, is highly important for the maintenance of shell integrity under conditions of strongly elevated seawater pCO₂. Tunnicliffe et al. (2009) could demonstrate that at very low water pH (pH = 5.36) and low carbonate saturation states (0.01–0.02), shell dissolution was efficiently prevented in mussels living close to very acidic deep-sea vents, when they were covered by an intact periostracum. Calcifying animals without periostracum are generally considered more vulnerable to ocean acidification than calcifiers protected by an organic layer (Ries et al. 2009; Lischka et al. 2011; Rodolfo-Metalpa et al. 2011). Fractures in the periostracum have been shown to favor shell dissolution in Baltic blue mussels as well (Thomsen et al. 2010). These examples underline the importance of an intact periostracal layer.

Its formation is dependent on tyrosinase activity, which was detected enzymatically in the periostracum and mantle margin (Waite and Wilbur 1976). Moreover, mRNA coding for tyrosinase was found in inner and outer mantle tissue of *P. fucata*, and a tyrosinase protein has recently been isolated from the prismatic layer of the oyster (Nagai et al. 2007).

We detected several tyrosinases in the *M. edulis* transcriptome. Two of these were analyzed by quantitative real-time PCR: one was present predominantly in the outer mantle (TYR2) and one was expressed in inner and outer mantle tissues (TYR1). Similarly, tissue-specific expression could also be demonstrated for *P. fucata*, with PfTYR1 in mantle pallial and edge and PfTYR2 in mantle pallial (Nagai et al. 2007). The outer mantle tissue-specific TYR2 was not differentially regulated under changing $p\text{CO}_2$, but TYR1, expressed in both tissues at equal levels, reacted with a 75- and 220-fold increase in expression in the outer and inner mantle, respectively. In response to acidified seawater, an increase in L-DOPA concentration, the intermediate of the tyrosinase reaction, was found in the inner mantle tissue of *A. cygnea* (Soares-da-Silva et al. 1998) as well as in the mantle area underlying damaged shell parts in *Crassostrea gigas* (Almeida et al. 1998). Moreover, a higher DOPA content was detected in newly formed periostracum compared to older parts (Waite and Andersen 1978). It seems reasonable that changes in DOPA concentration are matched by alterations in tyrosinase activity and enhanced gene expression. The $p\text{CO}_2$ -induced increase in the total amount of the studied tyrosinase transcripts in both mantle tissues supports this view and indicates a higher demand for tyrosinase protein.

The comparison of the copper-binding site CuA (Fig. 2, supplement), responsible for the phenoloxidase activity (Olivares and Solano 2009), and the reconstruction of a phylogenetic tree (Fig. 3 supplement) from several tyrosinases of the *M. edulis* transcriptome together with those from other phyla shows a noticeable differentiation of genes with tyrosinase functions and indicates a high degree of specialization and importance of tyrosinases in the molluscan phyla. MeTYR1 and MeTYR2 cluster in separate groups. Thus, both tyrosinases TYR1 and TYR2 may differ with respect to specificity and functional properties, and an altered function may be necessary under conditions of high $p\text{CO}_2$. So far, it remains unclear what the increased tyrosinase expression in the inner mantle is needed for, as this tissue is located far away from the active site of periostracum synthesis (Bubel 1973). The inner mantle tissue can secrete periostracum-like structures in response to shell fracture (Uozumi and Suzuki 1979), but it is unclear whether tyrosinase-mediated tanning processes can aid in preventing dissolution at the inner shell surface (e.g., Melzner et al. 2011) or whether tyrosinases can be exported from inner mantle

regions toward the mantle edge in order to promote increased sclerotization of the periostracum under acidified conditions. As TYR2 is predominately expressed in the outer mantle and did not respond to $p\text{CO}_2$, an involvement in regular periostracum formation during shell growth may be postulated, whereas TYR1, expressed similar in both tissues, may function as maintenance and repair system, inducible under stressful conditions. Further research on the exact localization, expression and functional characteristics of tyrosinases in bivalve mantle tissues is needed to support this hypothesis.

Implications of hypercapnia for the metabolic and energy network

In this study, the expression of several genes and pathways was assessed in order to identify a possible underlying network responding to hypercapnia. Genes important for aerobic and anaerobic energy production (ATP synthase subunits, SDH, HK, PK) were assessed, as well as genes involved in protein translation (EFalpha) and ribosome metabolism (DBP4), amino acid metabolism (AspAT, AMT, GDH), cell homeostasis and ion regulation (NKA) and stress response (MYTs, PRX).

The expression of F-ATPase subunits from both the F_0 and the F_1 complex was down-regulated under moderately elevated $p\text{CO}_2$ in the outer mantle (Fig. 2a–c). These results are in line with a decrease in ATP synthase expression under elevated $p\text{CO}_2$ in sea urchin larvae (Todgham and Hofmann 2009). As the correlation plot (Fig. 3) indicates a very strong correlation of all subunits in both tissues, a coordinated transcriptional regulation of F-ATPase subunits seems likely in *M. edulis*, similar to the findings described for carp ATP synthase upon thermal acclimation (Itoi et al. 2003). In *Crassostrea gigas*, decreased ATP levels were found in mantle tissue upon long-term hypercapnic exposure (Lannig et al. 2010). Together, these results indicate a decrease in capacities for aerobic ATP synthesis under moderate hypercapnia in *M. edulis* mantle tissue, which may explain reduced rates of costly biomineralization. Besides, enhanced whole-animal oxygen consumption under moderate CO_2 levels (Thomsen and Melzner 2010) indicates higher oxygen demand of other tissues apart from mantle causing a net increase. Higher HK expression (Fig. 2f), together with a decrease in ATP synthase expression under moderate hypercapnia, may indicate a shift toward an elevated fraction of anaerobic metabolism supporting ATP demand in mantle tissue. A potential increase in glycolysis is supported by data demonstrating HK as rate-limiting enzyme of glycolysis in *M. edulis* (Zaba 1981). In the teleost fish *Sparus aurata*, long-term hypercapnic incubation was also postulated to cause a shift toward an increased fraction of anaerobic capacities (Mich-

aelidis et al. 2007). The coordinated regulation of transcripts from aerobic and anaerobic metabolism is illustrated in the correlation plot (Fig. 3; Fig. 1 supplement). In both tissues, cluster I was created by strong correlations between aerobic (FF1a, FF1g, FFOc) and the anaerobic ATP production step (PK) of the respiratory chain and glycolysis, respectively. Instead, neither HK as initiation point of glycolysis is correlated with PK above the threshold, nor genes coding for members of the TCA cycle mediated between PK and the ATPase subunits. The correlation between the F-ATPase subunits and PK and the clustering of HK with cluster III argue against a simple shift between anaerobic and aerobic pathways. Together, the functional role seems to be prevalent for defining the regulatory network and not necessarily the position in a certain pathway.

Genes coding for members of the TCA cycle defined cluster II (Fig. 3a, b). While their response was not quite significant in response to CO₂, they showed similar patterns of regulation as the translation factor EFalpha, which in turn significantly responded to hypercapnia (Fig. 2k). EFalpha has a function in supporting the binding of aminoacyl tRNA to ribosomes (Riis et al. 1990), thereby regulating the translational process. In shrimp hemocytes, increased mRNA levels of EFalpha1 were found following acclimation to acidified seawater (Wang et al. 2011). In *M. edulis*, EFalpha expression increased only at intermediate pCO₂ but dropped to control levels at high pCO₂, thus resembling the hyperbolic patterns of aerobic metabolic rate observed on the whole-animal level in the same experimental groups (Thomsen and Melzner 2010).

The O/N ratio, which describes the proportion of carbohydrates, lipids and proteins used in metabolism, increased slightly under moderate CO₂ and declines at high CO₂ (Thomsen and Melzner 2010). O/N ratios around 20, as found for the experimental animals (Thomsen and Melzner 2010), indicate a preference in amino acid catabolism (Mayzaud and Conover 1988). Under hypercapnia, a linear and dose-dependent elevation of NH₄⁺ excretion indicated an enhanced protein metabolism (Thomsen and Melzner 2010).

In the present study, all genes related to protein metabolism clustered tightly together with the translation factor EFalpha in cluster II (Fig. 3). Although expression of AMT, which is an enzyme involved in the glycine cleavage system and produces ammonia (Kikuchi et al. 2008), and that of GDH, which catalyzes the formation of α ketoglutarate and NH₄⁺ out of glutamate, was not significantly regulated with pCO₂—due to a very high individual variability (Fig. 2)—their tight correlation with each other and with genes of the TCA cycle (IDH, SDH) and EFalpha suggests a coordinated regulatory pattern. The position of the genes related to the TCA cycle indicates a predominant function in protein metabolism. Furthermore, the RNA helicase

DBP4, involved in ribosome metabolism, is incorporated into this cluster. Thus, cluster II may represent a protein and NH₄⁺ turnover regulon. Not surprisingly, NKA is tightly correlated with cluster II. It has been shown, for example, in crustaceans that Na⁺/K⁺ ATPase is able to transport NH₄⁺ instead of K⁺, thereby potentially contributing to ammonia excretion (Masui et al. 2002; Masui et al. 2009; Weihrauch et al. 2004). Similarly, the strong correlation of NKA with a number of cluster II members may indicate a potential function of the investigated Na⁺/K⁺ ATPase isoform to support enhanced NH₄⁺ excretion in *M. edulis* mantle tissue during exposure to hypercapnia.

Peroxiredoxin 6 is a cytoplasmic antioxidant protein with peroxidase activity; thus, its function involves coping with oxidative stress (Cox et al. 2010). Tomanek et al. (2011) documented significant increases and decreases in different peroxiredoxins in *Crassostrea virginica* mantle tissue in response to 2 weeks of acclimation to 357 Pa. However, no significant change in expression in mRNA of PRX in *M. edulis* could be detected, suggesting that hypercapnia does not evoke an enhanced differential expression of this particular PRX. Nevertheless, PRX is tightly correlated with cluster II genes (Fig. 3a, b). The connection via IDH may indicate a common dependence on NADP⁺ and NADPH, and other correlations seem to be less intuitive.

The third cluster of genes was only evident in the inner mantle, where genes involved in organic matrix and CaCO₃ formation were found tightly correlated together with MYTs and HK (Fig. 3). Mytilins are antimicrobial peptides with immune active functions. These peptides are mainly located in hemocytes and in plasma (Mitta et al. 2000; Charlet et al. 1996) and transported and released at sites where needed. However, no increased expression of MYT transcripts was found in response to acid stress. Based on the high number of mytilin reads sequenced in the transcriptome, we assume that a high concentration of mytilins is constitutively expressed in hemocytes and that the peptides are released under increased demand. No direct increase in antimicrobial peptides during bacterial invasion in the hemolymph of *M. edulis* (Charlet et al. 1996) and a constitutive expression of mRNA in *M. galloprovincialis* (Mitta et al. 2000) support this interpretation. However, levels of both antimicrobial peptides were higher in the outer mantle compared to the inner mantle. Especially, the mantle rim is constantly exposed to the outer environment, and a high immune defense might be important in this tissue. Although hemocytes and gills seem to exhibit highest immune capacity, the outer mantle in comparison with the inner mantle part showed higher expression in 11 of 17 immune-related transcripts (Philipp et al. 2012).

In the outer mantle, the connection between clusters I and II via pyruvate kinase is much more pronounced. As the algorithm draws only the largest correlation network,

the data indicate a strong common regulation of ATP and protein metabolism in the outer mantle, where shell growth takes place. In the inner mantle, the clustering of genes related to biomineralization together with stress-response genes may point toward an intricate connection between shell formation/shell repair and antimicrobial defense.

Conclusion

Acclimation to elevated seawater $p\text{CO}_2$ impacts gene expression patterns of several different pathways including calcification, metabolism and translational processes in the outer and inner mantle tissues of the blue mussel. We could demonstrate that elevated seawater $p\text{CO}_2$ decreased chitinase mRNA synthesis, a possible mechanism to reduce biomineralization costs due to enhanced chitin accretion. Increased tyrosinase expression may represent a protective mechanism against internal and external shell corrosions, as it could mediate enhanced periostracum and/or organic matrix tanning, rendering these chemically more inert. As chitinases and tyrosinases appear to have key roles in calcification and shell protection, further studies should elucidate in detail their precise location and function in the different mantle regions. Besides the CO_2 effects, we found that the expression of various genes was strongly tissue specific (e.g., shell matrix proteins in the outer mantle, genes involved in metabolism in the inner mantle), thereby sometimes overlying the effects of CO_2 treatment. By the use of correlation networks as exploratory tool, we were able to uncover possible underlying regulatory connections and the relations between different pathways. Most connections are not altered when removing $p\text{CO}_2$ correlations and thus seem to be prevalent features of the networks. Moreover, the persistent connections of the genes indicate an involvement of several genes in hypercapnic response, which remained hidden in classical single-gene analyses.

The animals of the present study belong to a population, frequently facing elevated $p\text{CO}_2$ levels in their natural habitat. Under optimal feeding conditions, a responsive adaptive molecular network became visible. The question whether these mechanisms are effective under limited natural nutrient conditions and in other populations with lower natural $p\text{CO}_2$ variability remains open.

Acknowledgments We would like to thank Ulrike Panknin and Katja Trübenbach for tissue sampling, as well as UP for her help with RNA isolation and cDNA synthesis. This study is part of the German joint project “Biological Impact of Ocean Acidification (BIOACID)” (3.1.3) and funded by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF, FKZ 03F0608B). It is a contribution to the PACES research program (work package 1.6) of the Alfred Wegener Institute funded by the Helmholtz Association. The Excellence Cluster ‘Future Ocean’ awarded grants to F.M., E.P., M.A.G. and P.R.

References

- Addadi L, Joester D, Nudelman F, Weiner S (2006) Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chem Eur J* 12:980–987
- Addadi L, Politi Y, Nudelman F, Weiner S (2008) Biomineralization design strategies and mechanisms of mineral formation: operating at the edge of instability. In: Novoa JJ, Braga D, Addadi L (eds) *Engineering of crystalline materials properties state-of-the-art in modeling, design and applications*. NATO Science for peace and security series B: physics and biophysics, Springer, Berlin, pp 1–15
- Almeida MJ, Machado J, Coelho MAV, Soares-da-Silva P, Coimbra J (1998) L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) secreted by oyster (*Crassostrea gigas*) mantle cells: function aspects. *Comp Biochem Physiol B* 120:709–713
- Andersen SO (2010) Insect cuticular sclerotization: a review. *Insect Biochem Molec* 40:166–178
- Beniash E, Addadi L, Weiner S (1999) Cellular control over spicule formation in sea urchin embryos: a structural approach. *J Struct Biol* 125:50–62
- Beniash E, Ivanina A, Lieb NS, Kurochkin I, Sokolova IM (2010) Elevated level of carbon dioxide affects metabolism and shell formation in oysters *Crassostrea virginica*. *Mar Ecol Prog Ser* 419:95–108
- Bubel A (1973) An electron-microscope study of periostracum formation in some marine bivalves. II. The cells lining the periostracal groove. *Mar Biol* 20:222–234
- Chapman RW, Mancia A, Beal M, Veloso A, Rathburn C, Blair A, Holland AF, Warr GW, Didinato G, Sokolova IM, Wirth EF, Duffy E, Sanger D (2011) The transcriptomic response of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, to environmental conditions. *Mol Ecol* doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05018.x
- Charlet M, Chernysh S, Philippe H, Hetru C, Hoffmann JA, Bulet P (1996) Innate immunity—isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J Biol Chem* 271(36):21808–21813
- Clark GR II (1976) Shell growth in the marine environment: approaches to the problem of marginal calcification. *Amer Zool* 16:617–626
- Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB (2010) Mitochondrial peroxide involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem J* 245:313–325
- de la Fuente A, Bing N, Hoeschele I, Mendes P (2004) Discovery of meaningful associations in genomic data using partial correlation coefficients. *Bioinformatics* 20(18):3565–3574
- Doney SC, Fabry VJ, Feely RA, Kleypas JA (2009) Ocean acidification: the other CO_2 problem. *Annu Rev Mar Sci* 1:169–192
- Ehrlich H (2010) Chitin and collagen as universal and alternative templates in biomineralization. *Int Geol Rev* 52(7–8):661–699
- Ellington WR (1993) Studies of intracellular pH regulation in cardiac myocytes from the marine bivalve mollusk, *Mercenaria campechiensis*. *Biol Bull* 184:209–215
- Endo H, Persson P, Watanabe T (2000) Molecular cloning of the Crustacean *DD4* cDNA encoding a Ca^{2+} -binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 276:286–291
- Falini G, Albeck S, Weiner S, Addadi L (1996) Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science* 271:67–69
- Falini G, Weiner S, Addadi L (2003) Chitin-silk fibroin interactions: relevance to calcium carbonate formation in invertebrates. *Calcif Tissue Int* 72:548–554
- Feely RA, Alin SR, Newton J, Sabine CL, Warner M, Devol A, Krembs C, Maloy C (2010) The combined effects of ocean acidification, mixing, and respiration on pH and carbonate saturation in an urbanized estuary. *Estuar Coast Shelf S* 88:442–449

- Hand SC, Hardewig I (1996) Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanisms and implications. *Annu Rev Physiol* 58:539–563
- Harper EM (1997) The molluscan periostracum: an important constraint in bivalve evolution. *Palaeontology* 40(1):71–97
- Hattan SJ, Laue TM, Chasteen ND (2001) Purification and characterization of a novel calcium-binding protein from the extrapallial fluid of the mollusc, *Mytilus edulis*. *J Biol Chem* 276(6):4461–4468
- Heinemann A, Fietzke J, Melzner F, Böhm F, Thomsen J, Garbe-Schönberg D, Eisenhauer A (2011) Conditions of *Mytilus edulis* extracellular body fluids and shell composition in a pH-treatment experiment: acid-base status, trace elements and $\delta^{13}\text{B}$. *Geochim Geophys Geosyst*. doi:10.1029/2011GC003790
- Itoi S, Kinoshita S, Kikuchi K, Watabe S (2003) Changes of carp F_0F_1 -ATPase in association with temperature acclimation. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 248:R153–R163
- Jacob DE, Wirth R, Soldati AL, Wehrmeister U, Schreiber A (2011) Amorphous calcium carbonate in the shells of adult *Unionoida*. *J Struct Biol* 173:241–249
- Jankowsky E (2011) RNA helicases at work: binding and rearranging. *Trend Biochem Sci* 36(1):19–29
- Kikuchi G, Motokawa Y, Yoshida T, Hiraga K (2008) Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proc Jpn Acad Ser B* 84:246–263
- Kramer KJ, Muthukrishnan S (2005) Chitin metabolism in insects. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill S (eds) *Comprehensive molecular insect science*. Vol. 4, biochemistry and molecular biology, chapter 3. Elsevier Press, Oxford, pp 111–144
- Lannig G, Eilers S, Pörtner HO, Sokolova IM, Bock C (2010) Impact of ocean acidification on energy metabolism of oyster, *Crassostrea gigas* – changes in metabolic pathways and thermal response. *Mar Drugs* 8:2318–2339
- Levi-Kalishman Y, Falini G, Addadi L, Weiner S (2001) Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using cryo-TEM. *J Struct Biol* 135:8–17
- Li S, Xie L, Zhang C, Zhang Y, Gu M, Zhang R (2004) Cloning and expression of a pivotal calcium metabolism regulator: calmodulin involved in shell formation from pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comp Biochem Physiol B* 138:235–243
- Lischka S, Büdenbender J, Boxhammer T, Riebesell U (2011) Impact of ocean acidification and elevated temperatures on early juveniles of the polar shelled pteropod *Limacina helicina*: mortality, shell degradation, and shell growth. *Biogeosciences* 8:919–932
- Machado J, Coimbra J, Castilho F, Sã C (1990) Effects of diflubenzuron on shell formation of the freshwater clam, *Anodonta cygnea*. *Arch Environ Contam Toxicol* 19:35–39
- Marie B, Zanella-Cléon I, Corneillat M, Becchi M, Alcaraz G, Plasseraud L, Luquet G, Marin F (2011a) Nautilin-63, a novel acidic glycoprotein from the shell nacre of *Nautilus macromphalus*. *FEBS J* 278:2117–2130
- Marie B, Le Roy N, Zanella-Cléon I, Becchi M, Marin F (2011b) Molecular evolution of mollusc shell proteins: insights from proteomic analysis of the edible mussel *Mytilus*. *J Mol Evol* doi:10.1007/s00239-011-9451-6
- Marin F, Luquet G, Marie B, Medakovic D (2008) Molluscan shell proteins: primary structure, origin and evolution. *Curr Top Dev Biol* 80:209–276
- Masui DC, Furriel RPM, McNamara JC, Mantelatto FLM, Leone FA (2002) Modulation by ammonium ions of gill microsomal (Na^+ , K^+)-ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. *Comp Biochem Physiol C* 132:471–482
- Masui DC, Mantelatto FLM, McNamara JC, Furriel RPM, Leone FA (2009) Na^+ , K^+ -ATPase activity in gill microsomes from the blue crab, *Callinectes danae*, acclimated to low salinity: novel perspectives on ammonia excretion. *Comp Biochem Physiol A* 153:141–148
- Mayzaud P, Conover RJ (1988) O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Mar Ecol Prog Ser* 45:289–302
- Melzner F, Stange P, Trübenbach K, Thomsen J, Casties I, Panknin U, Gorb SN, Gutowska MA (2011) Food supply and seawater $p\text{CO}_2$ impact calcification and internal shell dissolution in the blue mussel *Mytilus edulis*. *PLoS ONE* 6(9):e24223. doi:10.1371/journal.pone.0024223
- Merzendorfer H, Zimoch L (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol* 206:4393–4412
- Michaelidis B, Ouzounis C, Palaras A, Pörtner HO (2005) Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Ecol Prog Ser* 293:109–118
- Michaelidis B, Spring A, Pörtner HO (2007) Effects of long-term acclimation to environmental hypercapnia on extracellular acid-base status and metabolic capacity in Mediterranean fish *Sparus aurata*. *Mar Biol* 150:1417–1429
- Mingliang Z, Jianguang F, Jihong Z, Bin L, Shengmin R, Yuze M, Yaping G (2011) Effect of marine acidification on calcification and respiration of *Chlamys farreri*. *J Shellfish Res* 30(2):267–271
- Misogianes MJ, Chasteen ND (1979) A chemical and spectral characterization of the extrapallial fluid of *Mytilus edulis*. *Anal Biochem* 100:324–334
- Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, Salzert M, Roch P (2000) Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J Biol Chem* 275(17):12954–12962
- Nagai K, Yano M, Morimoto K, Miyamoto H (2007) Tyrosinase localization in mollusc shells. *Comp Biochem Physiol B* 146:207–214
- Olivares C, Solano F (2009) New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell Melanoma Res* 22(6):750–760
- Palmer AR (1983) Relative cost of producing skeletal organic matrix versus calcification: evidence from marine gastropods. *Mar Biol* 75:287–292
- Palmer AR (1992) Calcification in marine molluscs: How costly is it? *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1379–1382
- Philipp EER, Kraemer L, Melzner F, Poustka AJ, Thieme S, et al. (2012) Massively parallel RNA sequencing identifies a complex immune gene repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLoS ONE* 7(3):e33091. doi:10.1371/journal.pone.0033091
- Politi Y, Arad T, Klein E, Weiner S, Addadi L (2004) Sea urchin spine calcite forms via a transient amorphous calcium carbonate phase. *Science* 306:1161–1164
- Pörtner HO, Bock C, Reipschläger A (2000) Modulation of the cost of pH_i regulation during metabolic depression: a ^{31}P -NMR study in invertebrate (*Sipunculus nudus*) isolated muscle. *J Exp Biol* 203:2128–2417
- Pörtner HO, Langenbuch M, Reipschläger A (2004) Biological impact of elevated ocean CO_2 concentrations: lessons from animal physiology and earth history. *J Oceanogr* 60:705–718
- Ries JB, Cohen AL, McCorkle DC (2009) Marine calcifiers exhibit mixed responses to CO_2 -induced ocean acidification. *Geology* 37(12):1131–1134
- Riis B, Rattan SI, Clark BF, Merrick WC (1990) Eukaryotic protein elongation factors. *Trends Biochem Sci* 11:420–424
- Rodolfo-Metalpa R, Houlbrèque F, Tambutté É, Biosson F, Baggini C, Patti FP, Jeffree R, Fine M, Foggo A, Gattuso J-P, Hall-Spencer JM (2011) Coral and mollusc resistance to ocean acidification adversely affected by warming. *Nature Clim Change* 1:308–312
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4(4):406–425

- Schönitzer V, Weiss IM (2007) The structure of mollusc larval shells formed in the presence of the chitin synthase inhibitor Nikkomycin Z. *BMC Struct Biol* 7:71. doi:10.1186/1472-6807-7-71
- Soares-da-Silva IM, Almeida MJ, Serrão PM, Coelho MA, Machado J (1998) L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) in *Anodonta cygnea*: variation with acidosis. *Comp Biochem Physiol A* 120:463–468
- Suzuki M, Sakuda S, Nagasawa H (2007) Identification of chitin in the prismatic layer of the shell and a chitin synthase gene from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71(7):1735–1744
- Suzuki M, Saruwatari K, Kogure T, Yamamoto Y, Nishimura T, Kato T, Nagasawa H (2009) An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation. *Science* 325:1388–1390
- Taylor JD, Kennedy WJ (1969) The influence of the periostracum on the shell structure of bivalve molluscs. *Calc Tiss Res* 3:274–283
- R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. URL <http://www.R-project.org/>
- Thomsen J, Melzner F (2010) Moderate seawater acidification does not elicit long-term metabolic depression in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 157(12):2667–2676
- Thomsen J, Gutowska MA, Saphörster J, Heinemann A, Trübenbach K, Fietzke J, Hiebenthal C, Eisenhauer A, Körtzinger A, Wahl M, Melzner F (2010) Calcifying invertebrates succeed in a naturally CO₂-rich coastal habitat but are threatened by high levels of future acidification. *Biogeosciences* 7:3879–3891
- Todgham AE, Hofmann GE (2009) Transcriptomic response of sea urchin larvae *Strongylocentrotus purpuratus* to CO₂-driven seawater acidification. *J Exp Biol* 212:2579–2594
- Tomanek L, Zuzow MJ, Ivanina AV, Beniash E, Sokolova IM (2011) Proteomic response to elevated P_{CO2} level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. *J Exp Biol* 214:1836–1844
- Tunnicliffe V, Davies KTA, Butterfield DA, Embley RW, Rose JM, Chadwick WW Jr (2009) Survival of mussels in extremely acidic waters on a submarine volcano. *Nat Geosci* 2(5):344–348
- Uozumi S, Suzuki S (1979) “Organic membrane-shell” and initial calcification in shell regeneration. *J Fac Sci Hokkaido Univ Ser IV* 19(1–2):37–74
- Waite JH (1983) Quinone-tanned scleroproteins. In: Hochachka PW (ed) *The mollusca, Metabolic biochemistry and molecular biomechanics*, vol 1. Academic Press, New York, pp 467–504
- Waite JH, Andersen SO (1978) 3,4-Dihydroxyphenylalanine in an insoluble shell protein of *Mytilus edulis*. *Biochim Biophys Acta* 541:107–114
- Waite JH, Wilbur KM (1976) Phenoloxidase in the periostracum of the marine bivalve *Modiolus demissus* dillwyn. *J Exp Zool* 195:359–368
- Waite JH, Saleuddin ASM, Andersen SO (1979) Periostracin—a soluble precursor of sclerotized periostracum in *Mytilus edulis* L. *J Comp Physiol* 130:301–307
- Waldbusser GG, Voight EP, Bergschneider H, Green MA, Newell RIE (2011) Biocalcification in the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) in relation to long-term trends in Chesapeake Bay pH. *Estuar Coast* 34:221–231
- Wang L, Liu Y, Wang W-N, Mai W-J, Xin Y, Zhou J, He W-Y, Wang A-L, Sun R-Y (2011) Molecular characterization and expression analysis of elongation factors 1A and 2 from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Mol Biol Rep* 38:2167–2178
- Weihrauch D, Morris S, Towle DW (2004) Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *J Exp Biol* 207:4491–4504
- Weiner S, Addadi L (2011) Crystallization pathways in biomineralization. *Annu Rev Mater Res* 41:21–40
- Weiss IM (2010) Jewels in the pearl. *ChemBioChem* 11:297–300
- Weiss IM, Schönitzer V (2006) The distribution of chitin in larval shells of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *J Struct Biol* 153:264–277
- Weiss IM, Tuross N, Addadi L, Weiner S (2002) Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. *J Exp Zool* 293:478–491
- Yin Y, Huang J, Paine ML, Reinhold VN, Chasteen ND (2005) Structural characterization of the major extrapallial fluid protein of the mollusc *Mytilus edulis*: implications for function. *Biochem* 44:10720–10731
- Yotsumoto N, Takeoka M, Yokoyama M (2010) Tail-suspended mice lacking calponin H1 experience decreased bone loss. *Tohoku J Exp Med* 221:221–227
- Zaba BN (1981) Glycogenolytic pathways in the mantle tissue of *Mytilus edulis* L. *Mar Biol Lett* 2:67–74
- Zange J, Pörtner HO, Jans AWH, Grieshaber MK (1990) The intracellular pH of a molluscan smooth muscle during a contraction-catch-relaxation cycle estimated by the distribution of [¹⁴C]DMO and by ³¹P-NMR spectroscopy. *J Exp Biol* 150:81–93
- Zanker A (1984) Detection of outliers by means of Nalimov’s test. *Chem Eng* 91(16):74

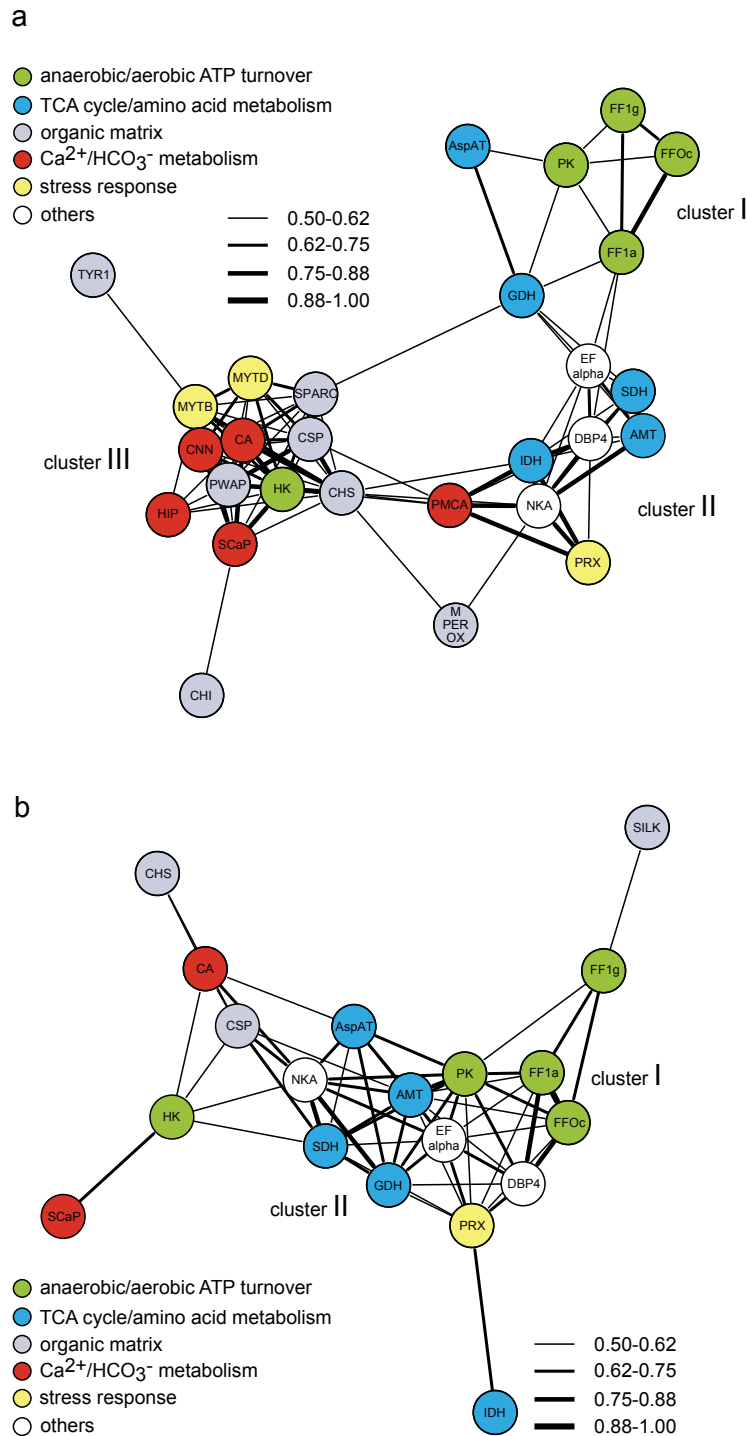


Fig. 1 supplement: Correlation network of genes in a) inner mantle tissue and b) outer mantle tissue based on the R-script after removing $p\text{CO}_2$ dependent correlations. Line width of vertices corresponds to correlation. Genes were set as correlated when Spearman's $|\rho| \geq 0.5$.

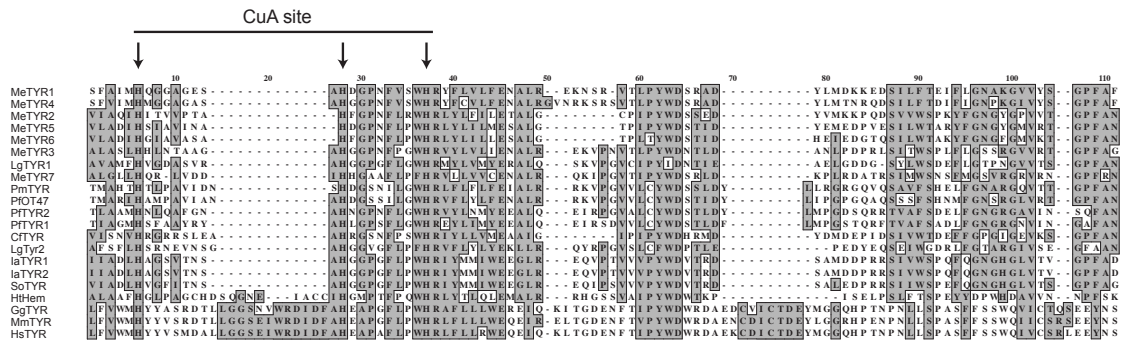


Fig. 2 supplement: Comparison of Copper-binding site CuA from several tyrosinases and one hemocyanin. Essential histidines, responsible for copper-binding are denoted with arrows. MeTYRs: *Mytilus edulis* putative tyrosinases from our transcriptome, LgTYR1: *Lottia gigantea* tyrosinase (ID: 166196 on JGI), PmTYR: *Pinctada maxima* tyrosinase (GH280185), PfOT47: *P. fucata* tyrosinase (DQ112679), PfTYR2: *P. fucata* tyrosinase (AB254133), PfTYR1: *P. fucata* tyrosinase (AB254132), CftYR: *Clamys farreri* tyrosinase (ACF25906.1), LgTYR2: *L. gigantea* tyrosinase (ID: 160808 on JGI), LaTYR1: *Ilex argentinus* tyrosinase (AB107880.1), LaTYR2: *I. argentinus* tyrosinase (AB107881.1), SoTYR: *Sepia officinalis* tyrosinase (AJ297474.1), HtHem: *Haliotis tuberculata* hemocyanin (CAC82192.1), GgTYR: *Gallus gallus* tyrosinase (AAB36375.1), MmTYR: *Mus musculus* tyrosinase (P11344.3), HsTYR: *Homo sapiens* (P14679.3).

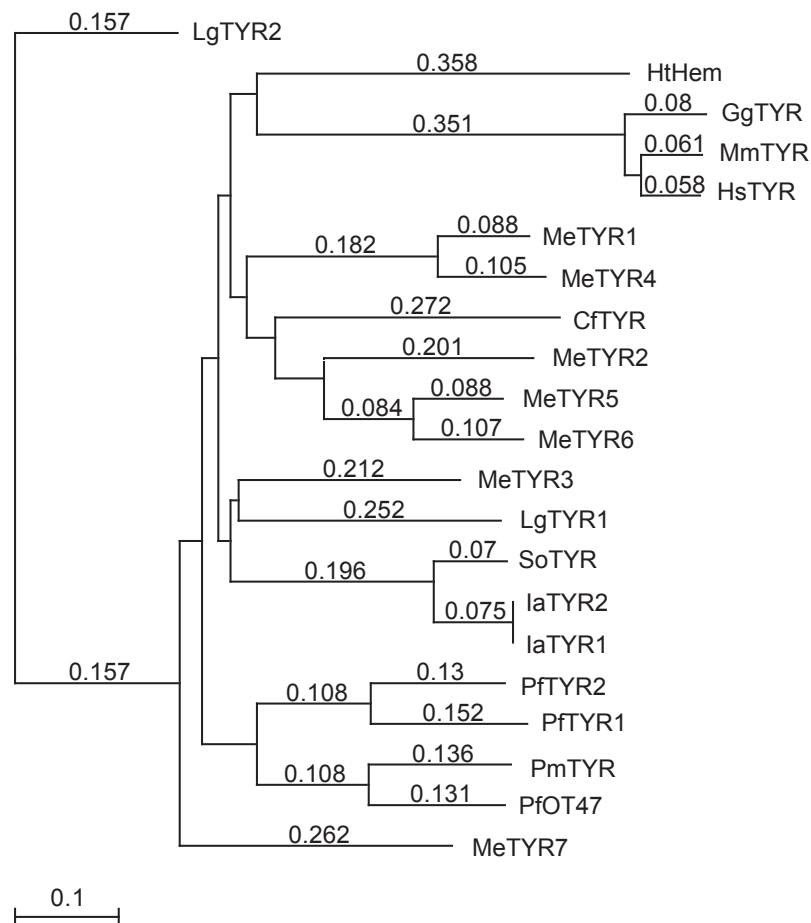


Fig. 3 supplement: Phylogenetic tree of protein sequences including CuA sites of several tyrosinases and one hemocyanin. The length of the used sequences varied between 77 and 111 amino acids. The tree was constructed with the neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987). Distances between the roots were un-corrected. For abbreviations see Fig. 2 supplement.

Publikation III

**Long-term acclimation to elevated P_{CO_2} in the blue mussel *Mytilus edulis*: energy budgets
and tissue-specific proteomics**

Anne K. Hüning, Jörn Thomsen, Marcus J. Zuzow, Julia Saphörster, Ulrike Findeisen, Hans-
Otto Pörtner, Magnus Lucassen, Lars Tomanek, Frank Melzner

eingereicht

The Journal of Experimental Biology

Long-term acclimation to elevated P_{CO_2} in the blue mussel *Mytilus edulis*: energy budgets and tissue-specific proteomics

Anne K. Hüning¹, Jörn Thomsen², Marcus J. Zuzow³, Julia Saphörster⁴, Ulrike Findeisen², Hans-Otto Pörtner¹, Magnus Lucassen¹, Lars Tomanek^{3*}, Frank Melzner^{2*}

¹Alfred Wegener Institute, Helmholtz Centre for Polar and Marine Research, Bremerhaven, Germany

²GEOMAR Helmholtz Centre for Ocean Research Kiel, Kiel, Germany

³California Polytechnic State University, Department of Biological Sciences, Center for Coastal Marine Sciences, Environmental Proteomics Laboratory, San Luis Obispo, USA

⁴Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Institut für klinische Molekularbiologie, Germany

*Corresponding authors: Frank Melzner

Address: Hohenbergstr. 2
D-24105 Kiel
Germany

Email: fmelzner@geomar.de

Telephone: +49(431)600-4274

Lars Tomanek
Address: Grand Avenue 1
CA-93407 San Luis Obispo
USA

Email: ltomanek@calpoly.edu

Telephone: +1(805)756-2437

Abstract

Ocean acidification is caused by the increased dissolution of gaseous CO₂ in ocean surface waters, resulting in a reduction of water pH and alterations in carbonate system speciation. In most studies short-term impacts of elevated P_{CO_2} on the physiology of marine organisms have been investigated so far. Long-term studies are largely absent. Thus, we acclimated *Mytilus edulis* from the Baltic Sea for one year to four P_{CO_2} levels (600, 1300, 2400 and 4200 μatm) and assessed whole organism energy budgets. The highest P_{CO_2} resulted in decreased shell growth (shell length: -7%, shell mass: -24%). This was brought about by linear reductions in food uptake (i.e. algae clearance rate), which resulted in reduced scope for growth, as routine metabolism and ammonium excretion rates were not significantly impacted by P_{CO_2} . To uncover the underlying molecular mechanisms, we studied the mantle and gill proteome, the tissues responsible for shell formation and feeding. 2D gel electrophoresis and mass spectrometric analysis revealed that the abundance of 8% of all detected mantle and gill proteins was altered in response to elevated P_{CO_2} , respectively. Of the affected proteins, 13 (42%) from mantle and 18 (41%) from gill tissue could be identified. Proteins that changed in abundance are mainly involved in cytoskeleton and extracellular matrix formation, as well as in oxidative stress response and protein degradation. Thus, moderate reductions in growth and calcification performance persisted even after one year, which were accompanied by significant changes in the gill and mantle proteome. Future studies need to characterize whether elevated P_{CO_2} directly impacts the feeding apparatus or whether decreases in food intake are due to a concerted modulation of the organismic energy budget.

Introduction

The atmospheric CO₂ concentration continues to increase due to persistently rising anthropogenic emissions. CO₂ levels have risen from around 260-270 ppm during the pre-industrial time period to a present concentration of >390 ppm (Wigley, 1983; Feely et al., 2009) and atmospheric CO₂ is predicted to rise to values up to ca. 700-1000 ppm by the year 2100 (Caldeira and Wickett, 2005; IPCC 2007). Approximately the half of the anthropogenic CO₂ has been taken up by the ocean surface (Sabine et al., 2004) resulting in lowered water pH (ocean acidification) and depletion of CO₃²⁻ (Sunda and Cai, 2012). This process is intensified by the up-welling of CO₂-enriched waters from deeper water layers in coastal regions and estuaries (Feely et al., 2008; Waldbusser et al., 2011). In Kiel Fjord, seawater CO₂ fluctuates seasonally and can exceed 2300 μatm during summer and autumn (Thomsen et al., 2010, 2013). Peak values of more than 4000 μatm have been predicted to occur within the next 100 years in such seasonally hypoxic, estuarine coastal waters (Melzner et al., 2013). It has been demonstrated that survival, growth, reproduction, calcification and behavior of marine species can be affected

adversely in response to alterations in seawater carbonate chemistry (Kroeker et al., 2010; Pörtner, 2008; Munday et al., 2012; Briffa et al., 2012).

Responses of bivalve mollusks to simulated ocean acidification are ontogeny dependent. Bivalve larvae can suffer from CO₂-induced developmental delay (Gazeau et al., 2010; Kurihara et al., 2008; Watson et al., 2009) and reduced survival (Andersen et al., 2013; Watson et al., 2009; Talmage and Gobler, 2011). Additionally, incubation in acidified seawater can result in reduced larval shell growth and shell stability, as well as in shell deformation (Gazeau et al., 2010; Gaylord et al., 2011; Andersen et al., 2013; Kurihara et al., 2008). Shell growth and calcification can also be reduced in juvenile and adult specimens in response to elevated P_{CO_2} (Range et al., 2012; Beniash et al., 2010; Michaelidis et al., 2005). Shell dissolution occurs either internally at the nacre of the inner shell surface or externally when the shell-surrounding organic layer, the periostracum, is abraded (Rodolfo-Metalpa et al., 2011; Thomsen et al. 2010; Melzner et al., 2011). Elevated P_{CO_2} has also been shown to affect absorption and filtration rates and absorption efficiency of the bivalves *Mytilus chilensis*, *Chlamys nobilis* and *Perna viridis* in long- and short-term experiments (Navarro et al., 2013; Liu and He, 2012).

Mussels of the genus *Mytilus* are distributed in the Northern and Southern hemisphere (Soot-Ryen, 1955) and are important in structuring benthic communities along coasts by supporting diverse associated fauna (Grzelak and Kuklinski, 2010; Koivisto and Westerborg, 2010; Lintas and Seed, 1994; Norling and Kautsky, 2007). Changes in mytilid mussel abundance in response to ongoing climate change may have severe effects on coastal ecosystem functioning. Thus, we initiated a number of studies characterizing the response of *Mytilus* to increased P_{CO_2} levels: Following an eight-week acclimation period to elevated P_{CO_2} , blue mussels from Kiel Fjord were characterized by enhanced ammonia excretion and metabolic rates, as well as reduced growth and calcification rates (Thomsen and Melzner, 2010). Susceptibility to acidification in this population was strongly related to energy supply, with higher food supply ameliorating negative effects of high P_{CO_2} (Melzner et al., 2011, Thomsen et al., 2013). P_{CO_2} dependent changes in mRNA expression of selected genes in mantle tissue indicated dynamic cellular acclimation responses after an acclimation phase of eight weeks (Hüning et al., 2013). However, neither long-term effects of elevated P_{CO_2} nor their potential cellular implications have been characterized for any *Mytilus* species.

Proteomic techniques can be used to focus on alterations in tissue specific protein abundances in response to changing environmental conditions, and can thus establish a mechanistic understanding of climate change impacts (Tomanek, 2011; Tomanek, 2012). A benefit of this methodology is that proteins and their dynamic changes are more closely related to functional changes in the cellular physiology of affected animals than changes in transcript levels. Hence, phenotypic plasticity is reflected more accurately in proteomic data sets (Silvestre et al., 2012). A number of studies have used proteomics to identify differentially

expressed proteins of marine organisms exposed towards a variety of environmental factors such as heat, salinity and oxidative stress, UV light exposure and water pollution (e.g. Tomanek and Zuzow, 2010; Fields et al., 2012; Tomanek et al., 2012; McDonagh and Sheehan, 2007; Campanale et al., 2011; Monsinjon et al., 2006). Proteomic studies on the impacts of elevated seawater P_{CO_2} on marine organisms are rare. Wong et al. (2012) identified abundance changes of proteins responsible for energy metabolism, respiration and chaperones in barnacle larvae, whereas Tomanek et al. (2011) mainly found an increase in abundance of oxidative stress proteins in oysters in response to a two-week incubation to elevated P_{CO_2} . Dineshram et al. (2012) showed that high P_{CO_2} resulted in decreased protein abundance in oyster larvae. Studies on the long-term effects of ocean acidification on the cellular proteome of organisms are absent so far.

Thus, in order to characterize the long-term effects of ocean acidification on physiological processes, we acclimated freshly settled blue mussels from the Baltic Sea for one year to elevated P_{CO_2} . We measured food assimilation, respiration, ammonium excretion and shell growth to calculate energy budgets. In addition, we determined protein abundance changes in outer mantle and gill tissue using a proteomic approach in order to identify proteins that might be related to physiological responses. We exposed the experimental animals to four different P_{CO_2} levels [600 (control), 1300, 2400 (intermediate) and 4200 (high) μatm], which are comparable to natural fluctuations in Kiel Bight (Thomsen et al., 2010), but also realistic values for near future acidification (Melzner et al., 2013). We hypothesized that (i) energy budget re-allocation would lead to lower scope for growth and calcification rates at high P_{CO_2} and that (ii) long term CO_2 acclimation would leave a footprint in the proteome of tissues instrumental for food acquisition and calcification.

Materials and Methods

Long-term acclimation experimental set up

Settled larvae of *Mytilus edulis* were collected on 5 x 5 cm PVC panels that were suspended at about 1 m depth in Kiel Fjord, Germany (54°19.8'N; 10°9.0'E) between July 20th to 30th 2010 and reared in a flow-through setup in four replicate tanks per P_{CO_2} -level (600, 1300, 2400 and 4200 μatm) for one year. The experimental design was almost identical to that used in our earlier publications (Thomsen et al., 2010; Melzner et al., 2011). Briefly, Kiel Fjord water was continuously supplied to a climate chamber at GEOMAR, filtered (5 μm) and pumped to a header tank that supplied the experimental tanks (capacity: ca. 18 l each) at a rate of 100 ml min^{-1} via gravity feed. Cultured algae (*Rhodomonas* sp.) were continuously supplied to the header tank via a peristaltic pump to enable permanent food supply, resulting in mean concentrations of 2000-2400 cells ml^{-1} in the experimental aquaria. Salinity, temperature and pH (NBS scale) were measured 3-5 times a week using a WTW 340i pH-meter and a WTW SenTix

81-electrode which was calibrated with Radiometer IUPAC precision pH buffer 7 and 10 (S11M44, S11 M007). Carbonate chemistry of the seawater was determined from pH_{NBS} and weekly measurements of total dissolved inorganic carbon (C_{T}) using an AIRICA autoanalyzer (Marianda GmbH, Kiel, Germany) with a precision of ca. $2\text{--}4 \mu\text{mol kg}^{-1}$ seawater. Accuracy of C_{T} measurements was ensured by using Certified Reference Material provided by Andrew Dickson (<http://andrew.ucsd.edu/co2qc/>). The carbonate system speciation (Tab. 1) was calculated from pH_{NBS} and C_{T} using CO2SYS (Lewis and Wallace, 1998) with dissociation constants from Roy et al. (1993, see table 1, 2).

Tab. 1: Carbonate system speciation August 2010 to August 2011, N=53 determinations per treatment. Mean values over the entire one year cycle and standard deviations, *calculated from C_{T} and pH_{NBS} measurements using CO2SYS.

Treatment	Salinity (psu)	Temperature (°C)	pH_{NBS}	C_{T} ($\mu\text{mol/kg}$)	A_{T}^* ($\mu\text{mol/kg}$)	$P_{\text{CO}_2}^*$ (μatm)	Omega Calcite*	Omega Aragonite*
600 μatm ($\pm\text{SD}$)	15.7 (± 1.1)	11.8 (± 5.0)	8.03 (± 0.06)	1894.1 (± 84.6)	1938.4 (± 82.7)	612 (± 87)	1.47 (± 0.28)	0.86 (± 0.17)
1300 μatm ($\pm\text{SD}$)	15.7 (± 1.0)	11.6 (± 5.1)	7.73 (± 0.05)	1953.6 (± 93.9)	1932.2 (± 88.0)	1254 (± 146)	0.76 (± 0.18)	0.45 (± 0.11)
2400 μatm ($\pm\text{SD}$)	15.7 (± 1.1)	11.6 (± 5.2)	7.46 (± 0.07)	2025.0 (± 101.7)	1934.5 (± 88.9)	2360 (± 343)	0.42 (± 0.11)	0.25 (± 0.07)
4200 μatm ($\pm\text{SD}$)	15.7 (± 1.0)	11.7 (± 5.2)	7.21 (± 0.06)	2112.5 (± 109.8)	1922.6 (± 84.0)	4237 (± 461)	0.24 (± 0.07)	0.14 (± 0.04)

Animals were cultured for a total of 52-54 weeks. The amount of animals per replicate aquarium was gradually reduced from >500 mussels to 40 mussels after the first six months of the experiment in order to maintain high algal densities in the experimental aquaria. Following 12 months of acclimation, animals were sampled for determination of shell mass, shell length and shell free dry mass (SFDM, Thomsen et al., 2010). A subset of animals from each replicate aquarium was used for determinations of respiration, filtration and ammonium excretion rates to calculate energy budgets.

Energy budget determination

Respiration rate measurements were performed in an intermitted-flow system composed of cylindrical 100 ml plexiglas chambers, which were incorporated into a measuring circuit using gas-tight Tygon tubing (R-3603, Saint-Gobain, France). Empty chambers served as controls for measurements of bacterial respiration. The chambers were placed in a 100 l water bath, filled with $0.2 \mu\text{m}$ filtered and UV-radiated Baltic seawater, which was equilibrated to the desired P_{CO_2} level and a temperature of 16.6°C . Water inside the respirometer chambers was continuously circulated using a peristaltic pump (MCP ISM 404, ISMATEC, Glattbrugg, Switzerland) at a rate of 2 ml s^{-1} . The decrease in PO_2 in the closed measuring circuit was recorded over 15 min, until the circuit was flushed with water from the water reservoir for 15 min using submersible pumps. Oxygen concentrations were recorded every 15 seconds using

fibre-optic oxygen sensors (needle-type optodes, Presens, Regensburg, Germany) inserted into the tubing of the measuring circuit via a plastic y-piece. Oxygen partial pressures never fell below 90% air saturation. Two independent measurement runs were carried out for each replicate aquarium. In each run, three randomly chosen mussels from a replicate aquarium were placed in the chambers and allowed to acclimate in the setup for 1 h. For the calculation of respiration rate, measured rates of both runs were averaged for each replicate. Ammonium excretion rates were calculated from the seawater concentration in the respiration chambers. Ammonium concentrations were determined according to Holmes et al. (1999). In brief, water samples (4 ml) were taken directly from each chamber before and after closing for oxygen consumption measurements and a reagent (1 ml), containing 1.49 mM orthophthaldialdehyde, 0.063 mM sodium sulfite and 21 mM sodium borate, was added immediately to the water samples. After two hours incubation in the dark, samples were measured using a SFM25 fluorometer (Kontron, Germany) at an excitation and emission wavelength of 360 and 422 nm, respectively. Molar oxygen consumption rates (MO_2) and ammonium excretion rates ($NH_4^+_{ex}$) are expressed as $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1}$ per shell free dry mass (SFDM) h^{-1} and $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1}$ SFDM h^{-1} , respectively.

Subsequent to the metabolic rate measurements, we determined clearance rates by transferring three animals into 2 l aquaria filled with 0.2 μm filtered seawater and equilibrated with gas mixtures of the desired P_{CO_2} . Clearance rates were calculated from the decrease of *Rhodomonas* cell concentration in the experimental aquaria over a course of 30 min. The experiments started following a 1 h recovery time by adding of *Rhodomonas* cells to an initial concentration of max 6600 cells ml^{-1} . Every 5 min a 20 ml water sample was taken and analyzed using a Coulter Counter (Z2 Coulter® Particle count and size analyzer, Beckman Coulter™, Krefeld, Germany). *Rhodomonas* concentration remained above 1500 cells ml^{-1} in order to avoid the cessation of filtration (Riisgård and Randløv, 1981). Aquaria without mussels served as controls.

Scope for growth was calculated from total energy uptake via filtration, subtracting energy loss by respiration and ammonium excretion. Metabolic energy losses were calculated by converting O_2 consumption and NH_4^+ excretion rates into J g^{-1} SFDM h^{-1} using a mean oxycaloric equivalent of $0.44 \text{ J } \mu\text{mol}^{-1} O_2$ and an energy value of $0.347 \text{ J } \mu\text{mol}^{-1} NH_4^+$ (Lauff and Wood, 1996; Elliott and Davison, 1975). Energy uptake was calculated from clearance rates, an assimilation efficiency of 80% determined for *M. edulis* (Kiørboe et al., 1981) and the mean *Rhodomonas* concentration (2000 cells ml^{-1}) present in the experimental aquaria during the incubation period. Energy content per *Rhodomonas* cell was calculated from its carbon content (45 pg cell $^{-1}$, Thomsen et al., 2013) and a conversion factor of 46 J mg^{-1} carbon (Salonen et al., 1976).

Protein preparation

The following protocols have been described in detail elsewhere and are based on previous proteomic studies on mollusks (Tomanek and Zuzow, 2010; Fields et al., 2011; Tomanek et al., 2011; Tomanek et al., 2012). Gill and outer mantle tissue was dissected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C in August 2011. Two pools of tissues of three randomly chosen animals of each aquarium were used, resulting in 8 samples per P_{CO_2} treatment level. First, tissue was weighed and disrupted with cooled glass homogenizers in homogenization buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 1% amidosulfobetaine-14 (ASB-14), 40 mM Tris base, 0.001% bromphenol blue, 40 mM dithiothreitol (DTT) and 0.5% immobilized IPG buffer (pH 4–7) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) at a ratio of 1:4 (tissue:buffer). Afterwards, the homogenate was centrifuged at room temperature for 30 minutes at 16,000 x g. Proteins were precipitated over night at -20°C from the supernatant by adding 10% ice-cold trichloroacetic acid in acetone at a ratio of 1:4 (homogenate:TCA/acetone). After centrifugation at 18,000 x g and 4°C for 15 minutes, the supernatant was discarded and the pellet was washed with ice-cold 100% acetone. Following additional centrifugation at 4°C the acetone was discarded and the pellet was rehydrated in buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 2% cholamidopropyl-dimethylammonio-propanesulfonic acid (CHAPS), 2% nonyl phenoxy polyethoxylethanol-40 (NP-40), 0.002% bromphenol blue, 0.5% ampholyte, 100 mM dithioerythritol (DTE) and 0.5% immobilized IPG buffer (pH 4–7) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Remaining cell debris was removed from the solution by centrifugation at room temperature for 10 minutes at 16,000 x g. The protein concentration of the supernatant was estimated with the 2D Quant Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) following the manufacturer's instructions.

Two-dimensional gel electrophoresis

For the first dimension, 400 µg of protein were loaded on immobilized pH gradient (IPG) strips (pH 4–7, 11 cm; GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) to separate proteins according to their isoelectric point (pI). Isoelectric focusing was performed with PROTEAN® IEF Cell (BioRad, Hercules, CA, USA) using the following steps: passive rehydration for 5h, active rehydration for 12h at 50V, run for 1h at 500V, 1h at 1000V and 5h at 8000V. Subsequently, the strips were frozen at -80°C for at least 30 minutes and then equilibrated in 375 mM Tris base, 6 M urea, 30% glycerol, 2% sodium dodecyl sulphate (SDS), 0.0002% bromphenol blue for 15 minutes, first with addition of 65 mM DTT, then, for another 15 minutes with 135 mM of iodoacetamide added to the equilibration buffer.

For the second dimension, IPG strips and molecular weight standards (BioRad, Hercules, CA, USA) were sealed by overlaying both with 0.8% agarose (dissolved in running buffer containing 25 mM Tris base, 192 mM glycine and 0.1% SDS) on top of a 12% polyacrylamide gels. The run was conducted for 55 minutes at 200 V with a Criterion Dodeca

Cell (BioRad, Hercules, CA, USA) in running buffer. Gels were stained over night with colloidal Coomassie Blue G-250, destained in MilliQ-water (Millipore, Billerica, MA, USA) and subsequently scanned (model 1280 with transparency unit; Epson, Long Beach, CA, USA).

Gel image analysis and statistical analysis

For each treatment and tissue we were able to prepare eight protein samples (by pooling three animals for each sample) that we separated through 2D gel electrophoresis. The respective gel images were analyzed using Delta2D software (version 4.1, Decodon, Greifswald, Germany). To align gels and obtain consistent abundance estimates, gels were warped to each other within groups first, and subsequently between groups (group warping strategy), generating match vectors. A fusion image with average spot abundances was used to detect spot boundaries, which were subsequently transferred to each gel using the generated match vectors. Changes in protein abundance patterns were analyzed using a One-Way-permutation ANOVA ($p < 0.05$) to detect significantly changed proteins. Subsequently, all putatively changed protein spots were checked manually for correct spot boundaries as well as artifacts. In mantle tissue six spots had to be deleted due to wrong spot boundaries and four spots due to artifacts, the same applied to six and one spot, respectively, in gill tissue. Ignoring these obviously incorrectly detected spots, a post-hoc test (Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$) was applied on the remaining spots to address differences between treatments.

Mass spectrometry

Significantly changed protein spots were excised from the gels and prepared for mass spectrometry. Initially, gel plugs were destained twice in 25 mM ammonium bicarbonate dissolved in 50% acetonitrile and dried in 100% acetonitrile. Proteins were digested over night at 37°C with trypsin (Promega, Madison, WI, USA, 11 ng/μl in 40 mM ammonium bicarbonate dissolved in 10% acetonitrile). On the following day, the supernatant was removed and stored, and the gel plugs were incubated twice with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in acetonitrile (2:1) to extract remaining peptides. Subsequently, samples were concentrated and dried using a SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Peptides were then dissolved in a solution containing 0.2 mg/ml α -hydroxycyano cinnamic acid (HCCA) in 0.1% TFA:acetonitrile (1:20) and applied on an AnchorchipTM target plate (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA). The spotted peptides were washed with 10 mM ammonium phosphate in 0.1% TFA and recrystallized with solution consisting of ethanol, acetone and 0.1% TFA (6:3:1).

Peptide mass fingerprints (PMFs) were obtained on a matrix assisted laser desorption ionization tandem time-of-flight (MALDI ToF-ToF) mass spectrometer (Ultraflex II; Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA). We chose a minimum of twelve peptides, whose charge state was assumed to be +1, to conduct tandem mass spectrometry, in order to obtain

enough information about the b- and y-ions of the peptide sequence to make a strong identification.

We used flexAnalysis (version 3.4; Bruker Daltonics Inc.) to analyze the spectra and internally calibrate the mass spectra with porcine trypsin data. The TopHat algorithm was used for baseline subtraction, the Savitzky-Golay analysis was used for smoothing (with: 0.2 m/z; number of cycles=1), and the SNAP algorithm was used to detect peaks (signal-to-noise ratio: 6 for MS and 1.5 for MS/MS). We used two databases that were utilized by Mascot Server (version 2.2; Matrix Science Inc., Boston, MA, USA) to obtain identifications. PMF and MS/MS data were combined prior to submitting the spectra data. Initially, searches were performed using our own EST library that contained sequence information for *Mytilus edulis* (study accession number ERP000937 and submission accession number ERA061781, Sequence Read Archive (SRA) of European Nucleotide Archive (EMBL)) followed by an NCBI protein search for Metazoa if the former yielded a non-significant result. Oxidation of methionine and carbamidomethylation of cysteine were included as variable modifications. Our search allowed one missed cleavage during trypsin digestion. For tandem mass spectrometry we used the default setting of a precursor-ion mass tolerance of 0.6 Da. The molecular weight search (MOWSE) score that indicated a significant hit was dependent on the database. For our *M. edulis* database, scores higher than 41 were significant ($p < 0.05$), while Metazoa searches greater than 45 were significant. In addition, we only accepted positive identifications that included at least two matched peptides in addition to a MOWSE score above the significance threshold.

Statistical data analysis

To test for significant differences in shell length, shell mass and shell-free dry mass a One-Way-ANOVA (SigmaStat, version 3.5, Systat Software, Erkrath, Germany) was used following a post-hoc test (Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$). Clearance, oxygen consumption, ammonium excretion and scope for growth were statistically analyzed by quadratic or linear regression using SigmaPlot (version 9.0., Systat Software).

Protein abundance data was used to test for differences in the proteomic response towards P_{CO_2} treatment. For this purpose, a two-dimensional ordination of the data was drawn using a non-metric multi-dimensional scaling (nMDS), which referred to a resemblance matrix generated by Bray-Curtis similarities. In the following, a One-Way Analysis Of Similarity (ANOSIM) was carried out to assign a significance of similarities in protein abundance values to the different P_{CO_2} values. We interpreted R -values < 0.25 as not different; $R > 0.5$ as overlapping but different to a certain degree and $R > 0.75$ as different according to Clarke and Gorley (2001). Primer 6 (version 6.1.6, PRIMER-E, Ivybridge, UK) was used for the nMDS and ANOSIM analysis.

Results

Growth, calcification and metabolism

Mussels grew from the settled pediveliger stage of about 500 μm shell length to juveniles with a mean shell length above 20 mm during the one-year exposure experiment. Only the highest P_{CO_2} level (4200 μatm) affected shell growth, resulting in smaller shell lengths when compared to control animals (20.7 ± 0.8 mm vs. 22.3 ± 0.7 mm, $F_{(3,12)}=4.38$, $p<0.05$, Fig. 1A). Shell masses of animals treated with 4200 μatm were lower (207.2 ± 27.0 mg) than those from control specimens (273.0 ± 24.5 mg, $F_{(3,12)}=5.23$, $p<0.05$, Fig. 1B). However, shells of the high CO_2 treated animals followed the same shell mass vs. shell length relationship as the control animals, indicating that shells were not abnormally thin in high CO_2 animals (Fig. 1C). No differences in shell-free dry mass were observed ($F_{(3,12)}=0.83$, $p=0.5$, Fig. 1D).

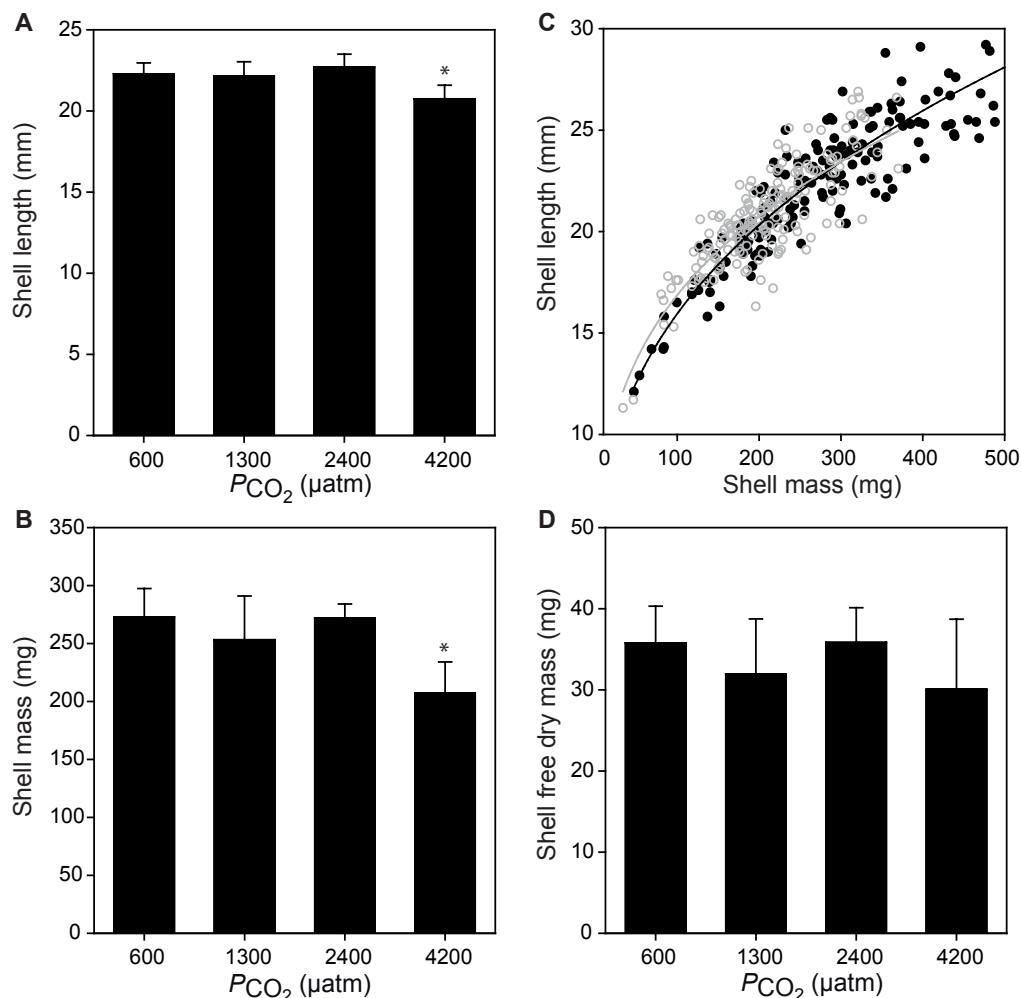


Fig. 1: Shell length (A), shell mass (B) and shell-free drymass (D) of *M. edulis* acclimated to four different P_{CO_2} levels. A One-Way-ANOVA was performed followed by a post-hoc test (Student-Newman-Keuls, $p<0.05$, SigmaStat). Each column displays the mean of animals from one treatment group and the respective standard deviation. Significant differences from the control (600 μatm) are denoted with *. Shell length and shell masses of animals from control (600 μatm , black) and high P_{CO_2} (4200 μatm , grey) were compared (C).

Clearance rates decreased linearly ($p < 0.0005$) with increasing P_{CO_2} from $366 \pm 44 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ at $600 \mu\text{atm}$ to $231 \pm 64 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ at $4200 \mu\text{atm}$, thereby declining by about 37% (Fig. 2A). Metabolic rates of mussels were not significantly impacted by high P_{CO_2} ($p > 0.66$) after one year of exposure. Mean oxygen consumption rates ranged between $60.7 \pm 15.8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ at $600 \mu\text{atm}$ and $53.0 \pm 13.5 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ at $4200 \mu\text{atm}$. NH_4^+ excretion rates were not significantly altered ($p > 0.15$) by elevated P_{CO_2} (Fig. 2C).

Since metabolic rates did not significantly change with increasing P_{CO_2} , the reduction in energy uptake with increasing P_{CO_2} led to a strong and significant decrease in scope for growth ($p < 0.013$) (Fig. 2D). Scope for growth decreased from $42.8 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ at $600 \mu\text{atm}$ to about $18.6 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (-57%) at $4200 \mu\text{atm}$.

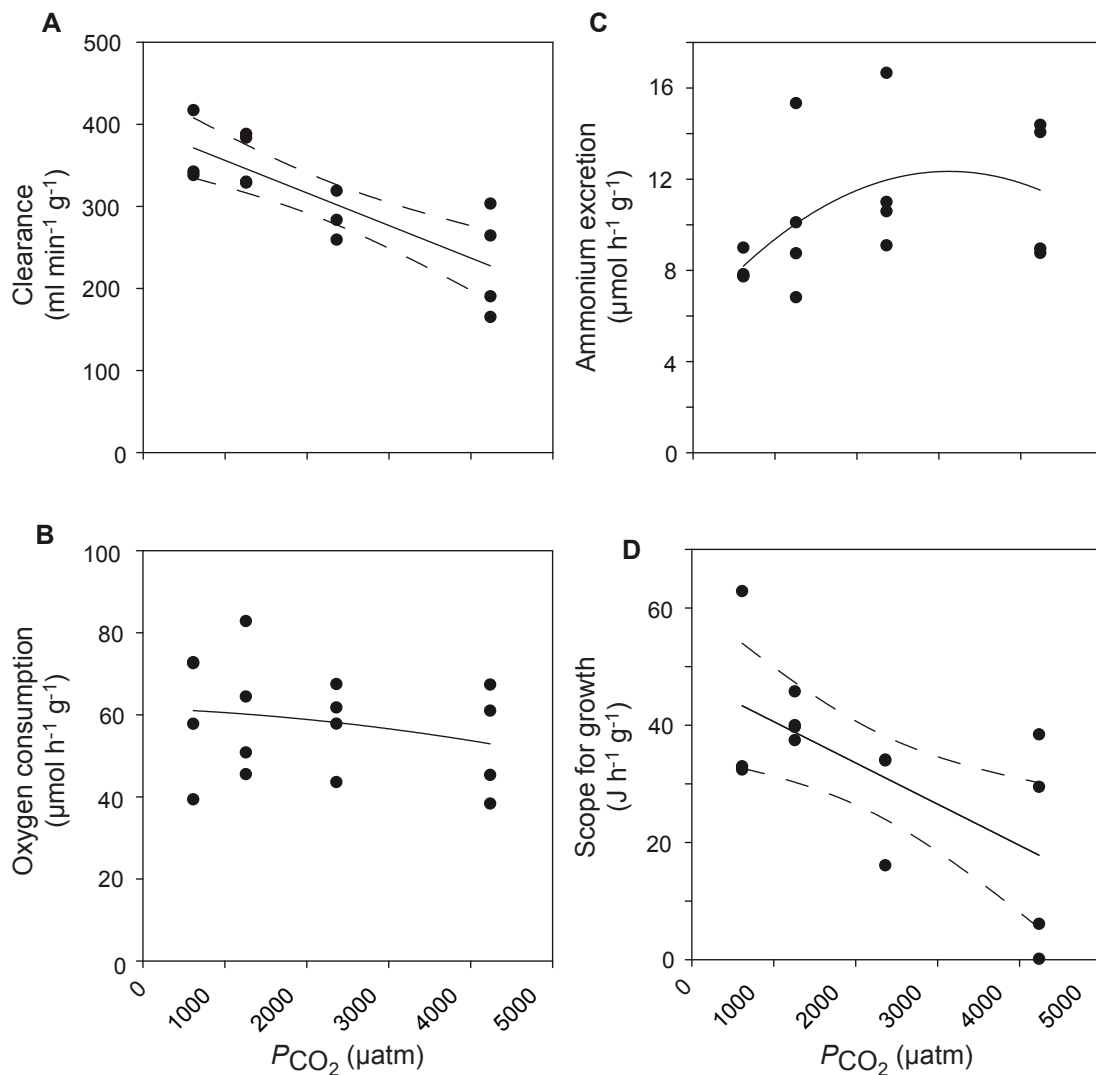


Fig. 2: Clearance (A), oxygen consumption (B), ammonium excretion (C) and scope for growth (D) as a function of four P_{CO_2} treatment groups. A dot displays two replicate measurements of three animals. Dashed lines illustrate 95% confidence intervals. (A) Clearance = $395.5938 (\pm 21.5675) - 0.0396 (\pm 0.0082) \times P_{\text{CO}_2}$; $R^2 = 0.6585$; $F = 23.1354$; $p = 0.0004$; $N = 13$. (B) Oxygen consumption = $61.6260 (\pm 12.0380) - 0.0008 (\pm 0.0126) \times P_{\text{CO}_2} - 3.0064 \times 10^{-7} (\pm 2.4864 \times 10^{-6}) \times P_{\text{CO}_2}^2$; $R^2 = 0.0608$; $F = 0.4210$; $p = 0.6650$; $N = 15$. (C) Ammonium excretion = $5.9089 (\pm 2.4769) + 0.0041 (\pm 0.0026) \times P_{\text{CO}_2} - 6.6101 \times 10^{-7} (\pm 5.1158 \times 10^{-7}) \times P_{\text{CO}_2}^2$; $R^2 = 0.2525$; $F = 2.1958$; $p = 0.1508$; $N = 15$. (D) Scope for growth = $47.6470 (\pm 6.2667) - 0.0070 (\pm 0.0024) \times P_{\text{CO}_2}$; $R^2 = 0.4189$; $F = 8.6497$; $p = 0.0123$; $N = 13$.

Proteomics of mantle and gill tissue

Following the removal of incorrectly matched spots, we detected significant changes in abundance in 31 out of 373 proteins (8%) in the outer mantle tissue and 44 out of 532 proteins (8%) in gill tissue. Proteins detected in the two tissues are shown in the corresponding proteome map (Fig. 3).

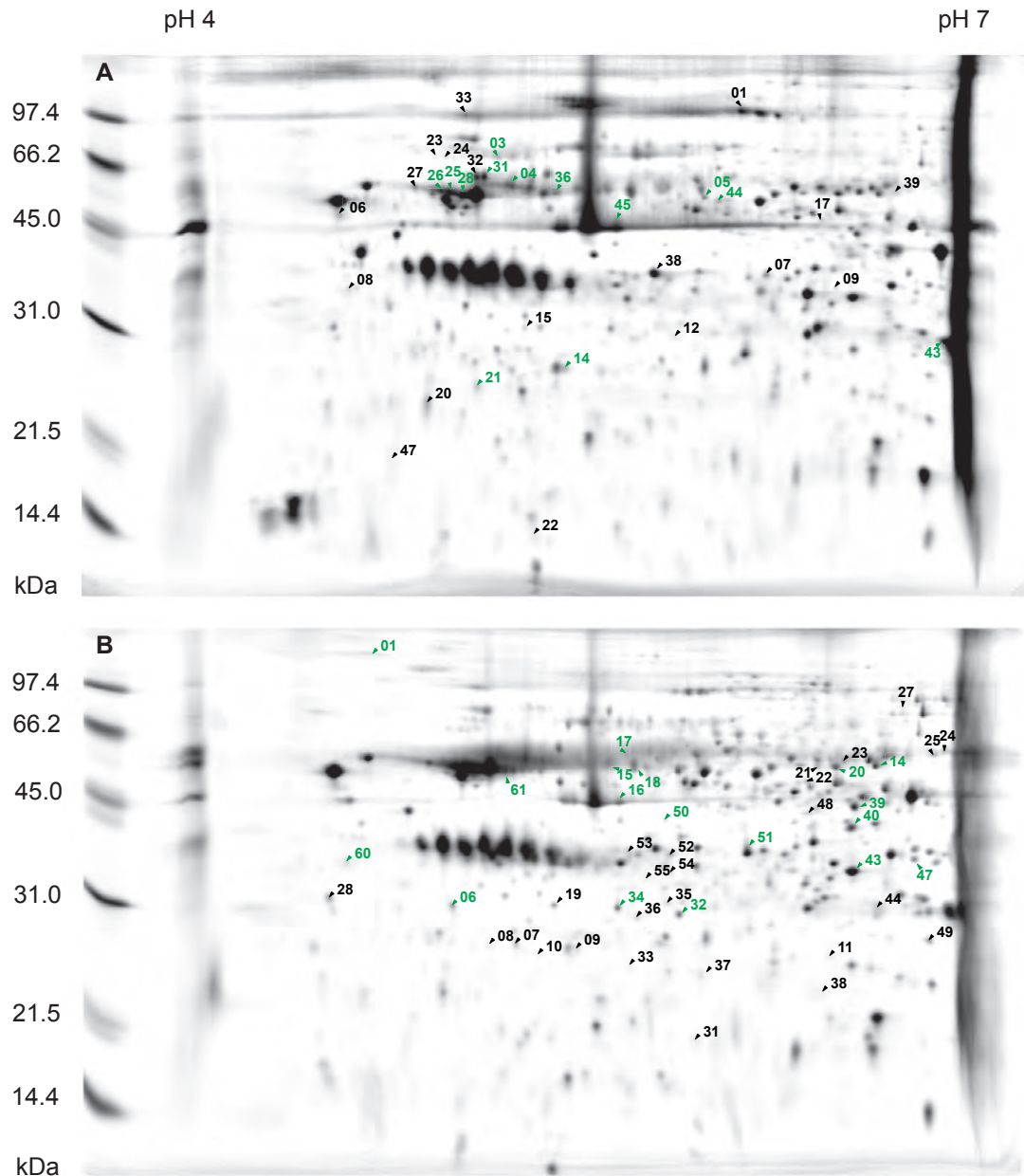


Fig. 3: Proteome map of mantle (A) and gill tissue (B). Out of all gels and treatments per tissue (32) we generated one composite gel with average spot volumes. After numbering each spot, a One-Way-ANOVA ($p < 0.05$) based on 1000 permutations was performed for detecting differences in protein abundances per tissue. Numbers and arrows illustrate significantly changed proteins. Identified protein spots are denoted by green numbers and arrows.

Out of these proteins, 13 (42%) and 18 (41%) could be identified in mantle and gill tissue, respectively (Tab. 2).

Tab. 2: Identifications of *M. edulis* mantle (A) and gill (B) proteins that changed in abundance after long-term incubation. Estimated molecular weight (M_r) and estimated isoelectric point (pI) were assessed from the proteome map. Average levels in protein abundance were calculated from the ratio of treatment/control. Values >1.0 represent an increase, <1.0 a decrease in protein abundance.

Spot ID	Protein ID	M_r (kDa) estimated	pI estimated	M_r (kDa) predicted	pI predicted	GenBank ID	Organism	MOWSE Score	Peptide Matches	Sequence Coverage (%)	Avg. Levels (relative to 600 μ m)		Functional Category
											1300 μ m	2400 μ m	
03	collagen α 5(VI) chain	75.00	5.20	247.94	5.94	gi405975735	<i>Crassostrea gigas</i>	172	4	8	0.74	1.05	extracellular matrix
04	collagen α 6(VI) chain	65.00	5.26	46.27	5.13	gi405961288	<i>Crassostrea gigas</i>	147	4	7	0.86	0.63	extracellular matrix
05	lectin-4	61.00	6.01	52.50	5.53	gi405967850	<i>Crassostrea gigas</i>	63	2	5	0.81	1.49	cytoskeletal
14	unknown protein (vWFA domain)	29.00	5.48	35.77	5.17	gi260810699	<i>Branchiostoma floridae</i>	143	4	5	0.45	2.04	extracellular matrix
21	unknown protein	27.00	5.14	127.56	4.87	gi121713138	<i>Aspergillus clavatus</i>	161	5	26	1.95	1.31	uncharacterized
25	β -tubulin	63.00	5.02	49.96	4.74	gi45598623	<i>Suberites domuncula</i>	147	9	17	0.94	0.73	cytoskeletal
26	β -tubulin	63.00	4.98	43.16	5.76	gi78190577	<i>Platyneris dumerilii</i>	117	3	14	0.87	0.71	cytoskeletal
28	β -tubulin	62.00	5.07	49.96	4.74	gi45598623	<i>Suberites domuncula</i>	127	5	12	0.89	0.68	cytoskeletal
31	aldehyde reductase	68.00	5.15	40.07	6.33	gi291241501	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	106	4	17	0.67	1.03	oxidative stress
36	intermediate filament protein	63.00	5.43	69.25	5.38	gi405950795	<i>Crassostrea gigas</i>	142	5	8	0.95	1.46	cytoskeletal
43	peptidyl-prolyl isomerase B	33.00	6.95	23.73	5.97	gi405963687	<i>Crassostrea gigas</i>	212	6	10	2.30	0.97	chaperone
44	actin	61.00	6.06	41.77	5.29	gi32816054	<i>Chlamys farreri</i>	84	3	10	0.63	2.32	cytoskeletal
45	β -actin	53.00	5.66	41.86	5.30	gi341579620	<i>Meretrix meretrix</i>	191	6	11	0.98	0.93	cytoskeletal

Spot ID	Protein ID	M_r (kDa) estimated	pI estimated	M_r (kDa) predicted	pI predicted	GenBank ID	Organism	MOWSE Score	Peptide Matches	Sequence Coverage (%)	Avg. Levels (relative to 600 μ m)		Functional Category
											1300 μ m	2400 μ m	
01	unknown protein (MAM domains)	131.00	4.70	137.96	5.80	gi405951868	<i>Crassostrea gigas</i>	67	3	4	0.77	0.59	extracellular domain
06	proteasome α 5 subunit	33.00	5.00	26.47	4.74	gi291243435	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	114	4	16	0.68	0.82	protein degradation
14	α -aminoaldehyde semialdehyde dehydrogenase	61.00	6.65	55.18	5.85	gi405978696	<i>Crassostrea gigas</i>	478	5	9	1.05	1.31	oxidative stress
15	β -tubulin	62.00	5.62	49.90	4.76	gi194068375	<i>Saccostrea kegaki</i>	60	3	7	1.25	1.11	cytoskeletal
16	actin	52.00	5.65	50.20	4.94	gi17116423	<i>Biophalaria pfeifferi</i>	199	5	11	1.00	0.76	cytoskeletal
17	α -tubulin	65.00	5.68	50.20	4.91	gi226478902	<i>Schistosoma japonicum</i>	302	5	9	1.21	1.09	cytoskeletal
18	collagen α 6(VI) chain	61.00	5.72	46.27	5.13	gi405961288	<i>Crassostrea gigas</i>	180	4	8	1.38	1.12	extracellular matrix
20	α -aminoaldehyde semialdehyde dehydrogenase	61.00	6.50	55.18	5.85	gi405978696	<i>Crassostrea gigas</i>	436	7	10	0.87	1.11	oxidative stress
32	sperm-associated antigen 8	32.00	5.88	23.62	6.01	gi405958072	<i>Crassostrea gigas</i>	129	2	7	0.96	0.87	cytoskeleton
34	prohibitin	32.00	5.65	29.88	5.36	gi157122974	<i>Aedes aegypti</i>	238	5	30	0.79	0.94	chaperone
39	extracellular signal-regulated kinase ERK2	50.00	6.58	41.42	6.42	gi39932277	<i>Tagliarica granosa</i>	162	5	16	0.92	0.91	protein phosphorylation
40	unknown protein (WD40 domain)	46.00	6.56	38.10	5.95	gi405965794	<i>Crassostrea gigas</i>	79	3	5	1.02	0.85	multifunctional
43	protein yfex (DyP-type peroxidase)	38.00	6.56	39.57	5.96	gi405978693	<i>Crassostrea gigas</i>	90	4	8	1.02	1.03	oxidative stress
47	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	40.00	6.81	34.69	6.06	gi405968006	<i>Crassostrea gigas</i>	53	2	13	0.88	0.84	protein degradation
50	isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit α	48.00	5.84	45.83	8.81	gi340714951	<i>Bombus terrestris</i>	78	3	4	0.71	0.37	energy metabolism
51	radial spoke head protein 9	42.00	6.15	30.99	5.20	gi40595992	<i>Crassostrea gigas</i>	86	2	12	1.48	1.57	cytoskeletal
60	β -tubulin	40.00	4.59	49.90	4.76	gi194068375	<i>Saccostrea kegaki</i>	245	7	15	0.57	0.94	cytoskeletal
61	β -tubulin	60.00	5.22	49.90	4.76	gi194068375	<i>Saccostrea kegaki</i>	107	4	10	0.65	0.74	cytoskeletal

We had expected to reach higher identification values, as we used a transcriptome with ca. 74,600 contigs (average length: 645 nucleotides) of the same *M. edulis* population for protein searches. This transcriptome was generated from different tissues (hemocytes, gills, mantle, foot, digestive gland, adductor muscle) under various stressors (elevated temperature, injury, lipopolysaccharide, flagellin, CO₂, dimethyl-silapentane-sulfonate (DSS), anoxia), so that most genes should have been expressed (Philipp et al., 2012).

In mantle tissue, most of the identified proteins with a changed pattern in abundance are part of the cytoskeleton (actin, tubulin, tektin-4, intermediate filament protein) or extracellular matrix (collagen). Additionally, changes in abundance were found for a protein containing a von Willebrand Factor type A (vWFA) domain (for more details, see below), an uncharacterized protein (M21), an aldehyde reductase and a peptidyl-prolyl isomerase B. In gill tissue, differentially expressed and identified proteins are involved in a broad range of cellular functions, including the cytoskeleton (actin, tubulin, sperm-associated antigen 8, radial spoke head protein 9), extracellular matrix (unknown protein containing MAM domains, collagen), scavenging of reactive oxygen species (α -aminoadipic semialdehyde dehydrogenase), protein degradation (proteasome subunits), energy metabolism (isocitrate dehydrogenase subunit α), protein modification (extracellular signal-regulated kinase ERK2), chaperoning (prohibitin) and multifunctional properties (unknown protein with WD40 domain).

Hierarchical clustering of protein abundance patterns using Pearson correlation (Fig. 4) revealed four clusters for mantle tissue. The first cluster is characterized by highest protein abundances at 2400 μ atm. Identified proteins within this cluster are mainly cytoskeletal elements (actin, tektin-4, intermediate filament protein) as well as the vWFA domain containing protein. The proteins within the second cluster had a minimum in abundance at 1300 or 2400 μ atm and highest values at 4200 μ atm. Out of those, collagen α -5(VI) chain (M3), an aldehyde reductase and β -actin could be identified. Proteins contributing to the third cluster are characterized by a maximum in abundance under control conditions. Identified members are β -tubulins and collagen α -6(VI) chain (M4). Proteins composing the fourth cluster were most abundant at 1300 μ atm. An unknown protein and a peptidyl-prolyl isomerase B are grouped within this cluster.

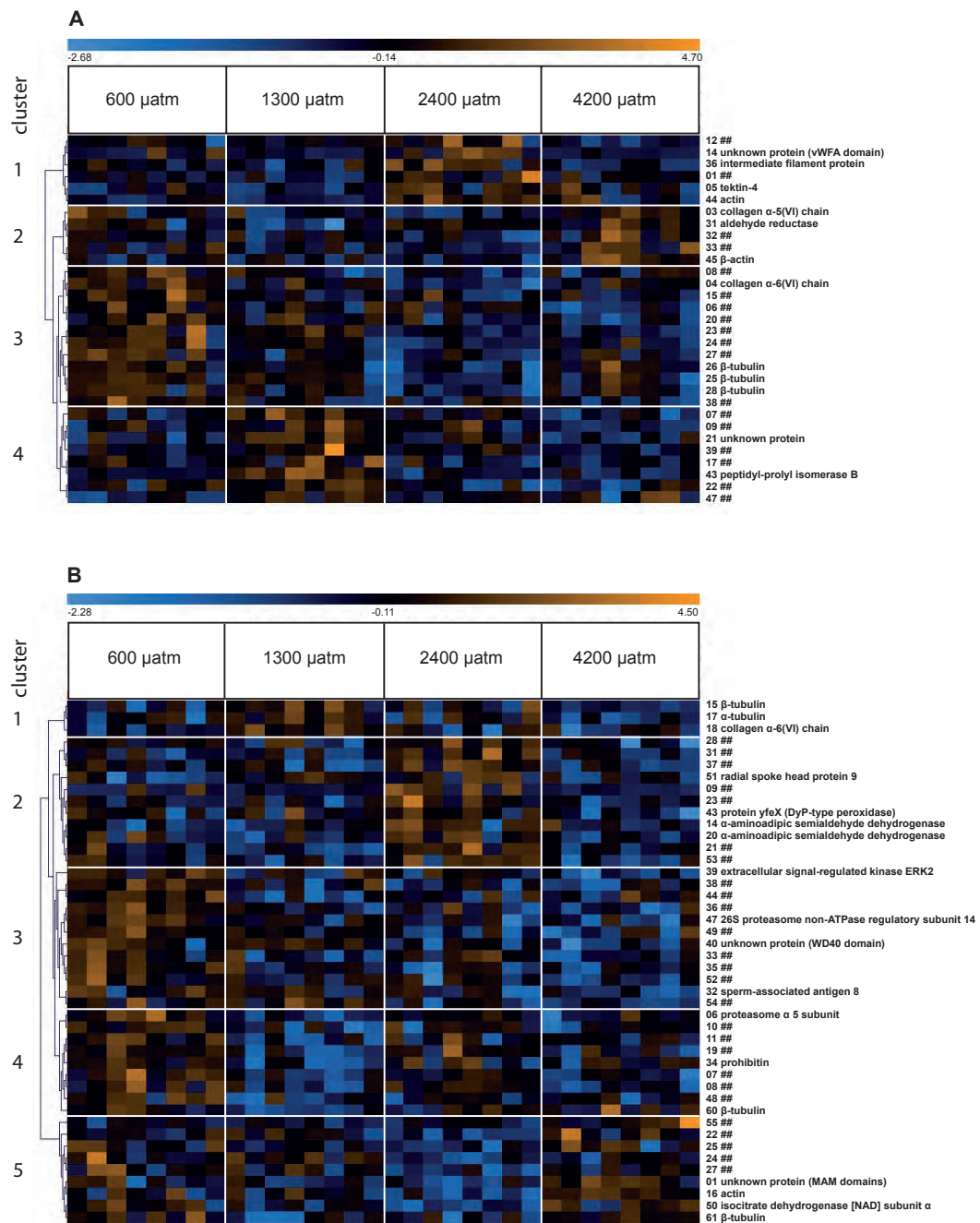


Fig. 4: Hierarchical clustering of significantly altered proteins from mantle (A) and gill (B) using Pearson correlation. From each protein, a mean value of normalized spot volume was calculated. Single boxes are coloured blue when the abundance is lower than the average and orange, when the abundance is higher. Each row displays one protein over the four treatment groups, one column all detected proteins from one gel. ## assigns not-identified proteins.

Five clusters were generated for gill tissue proteins. Proteins contributing to the first cluster (tubulins (G15, 17) and collagen α -6(VI) chain) had highest abundances at 1300 μ atm. Members of the second cluster are characterized by increased abundance at 2400 μ atm. Identified proteins are part of cilia (radial spoke head protein), involved in oxidative stress response (protein of DyP-type peroxidase superfamily) and lysine degradation (α -amino adipic semialdehyde dehydrogenase). Proteins of the third cluster had highest abundance under control

P_{CO_2} and in most instances lowest abundance at highest P_{CO_2} . Identified proteins function in protein phosphorylation (ERK2), protein degradation (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14), cytoskeleton formation (sperm-associated antigen) or are characterized by multifunctional properties (WD40 domain containing protein). The fourth cluster is characterized by highest protein abundance at control P_{CO_2} and lowest abundance at 1300 μatm . Proteins responsible for protein degradation (proteasome α subunit), mitochondrial chaperoning (prohibitin) and cytoskeleton formation (β -tubulin) cluster within. Proteins of the fifth cluster can be described by lowest abundance at 2400 μatm or 1300 μatm and an increase in abundance towards 4200 μatm . Identified proteins of this group are involved in the reception of extracellular signals (MAM domains containing protein), cytoskeleton formation (tubulin, actin) and energy metabolism (NAD-dependent isocitrate dehydrogenase). Graphs illustrating abundance patterns for each protein spot can be found in the supplement (Fig. S1 and S2).

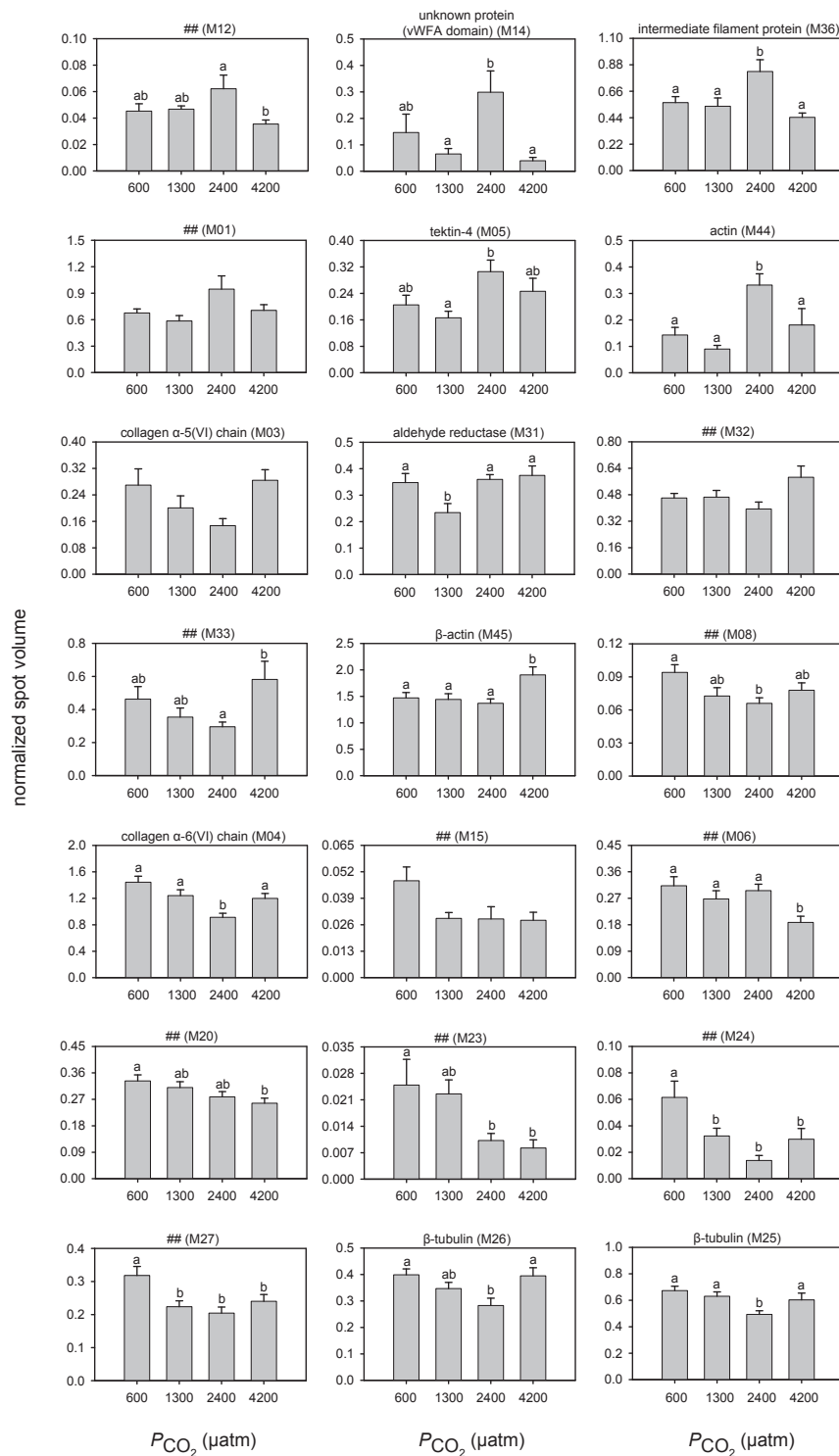


Fig. S1: Abundance levels of single significantly changed proteins in mantle tissue of *M. edulis*. A One-Way-ANOVA based on 1000 permutations (Delta2D, Decodon) was performed followed by a post-hoc test (Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$, SigmaStat). Spot volumes were calculated by normalizing each spot with the total volume of the entire protein spots. Graphs display the mean of each group ($N = 8$) and the standard error of the mean. Significances are denoted with letters. ## assigns not-identified proteins.

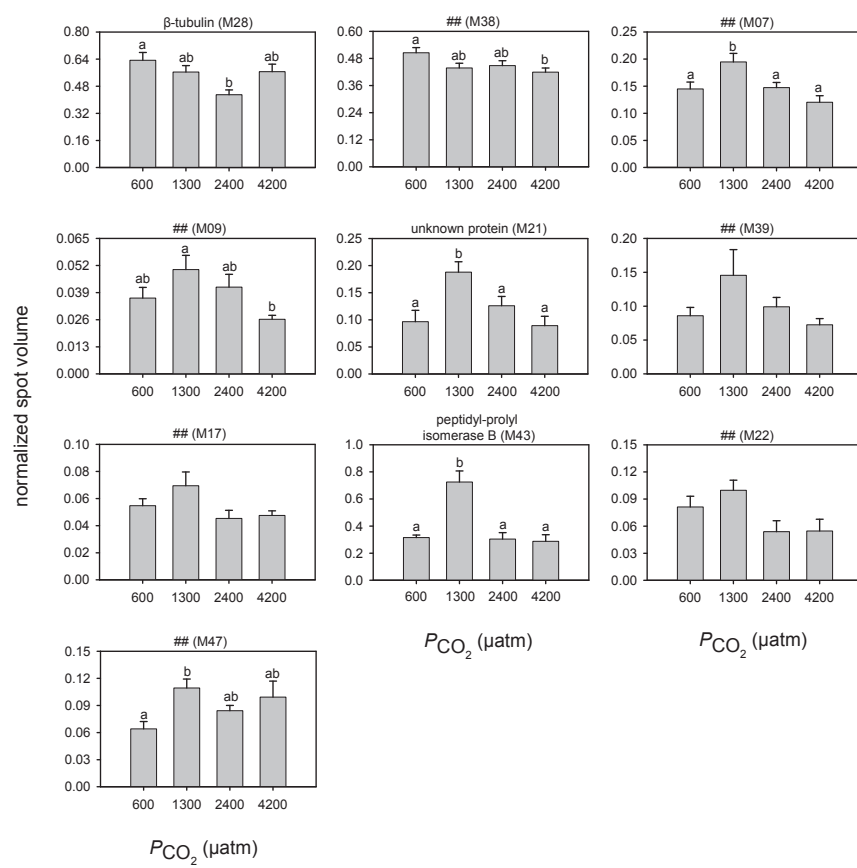


Fig. S1: continued

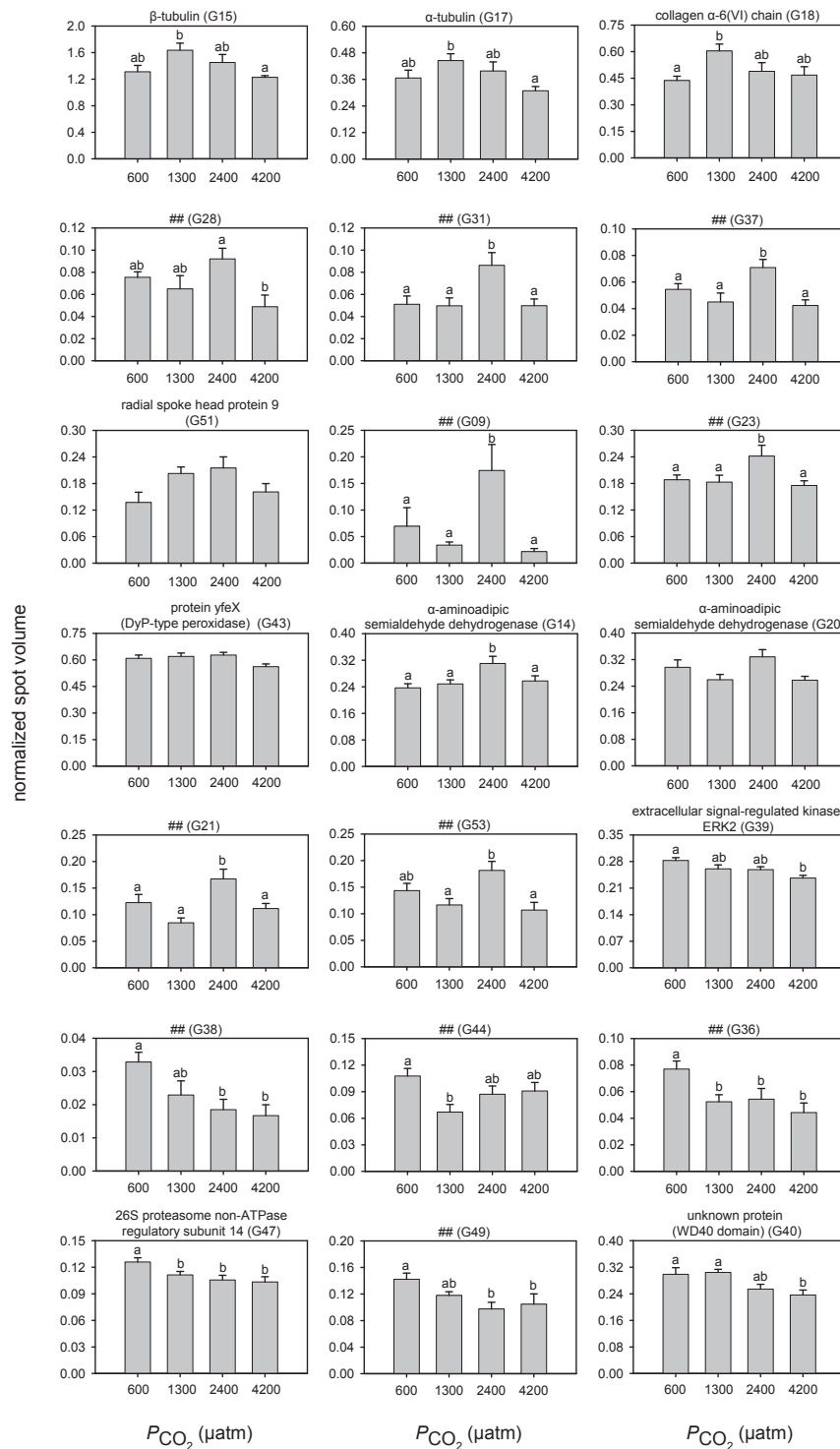


Fig. S2: Abundance levels of single significantly changed proteins in gill tissue of *M. edulis*. A One-Way-ANOVA based on 1000 permutations (Delta2D, Decodon) was performed followed by a post-hoc test (Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$, SigmaStat). Spot volumes were calculated by normalizing each spot with the total volume of the entire protein spots. Graphs display the mean of each group ($N = 8$) and the standard error of the mean. Significances are denoted with letters. ## assigns not-identified proteins.

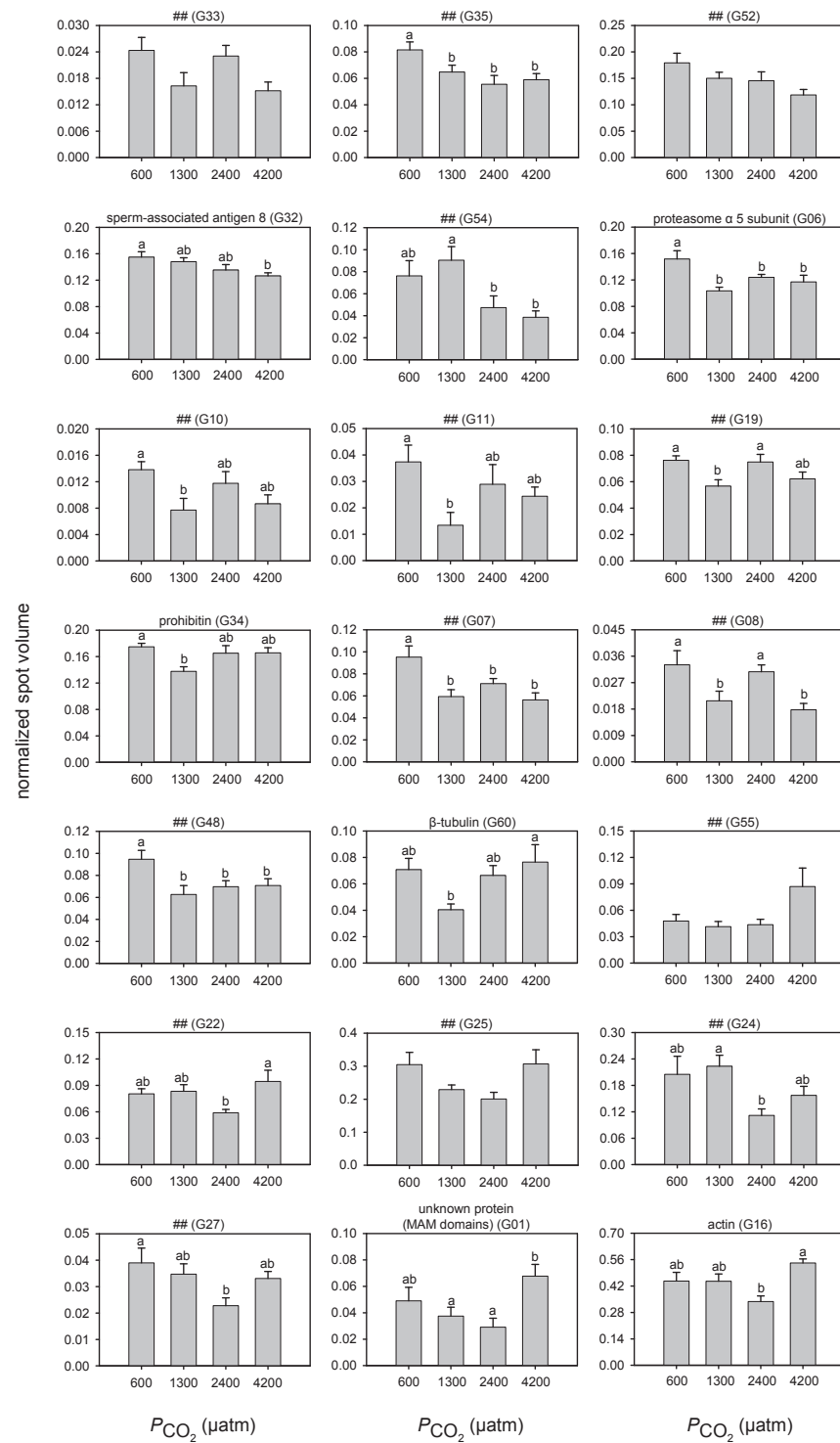


Fig. S2: continued

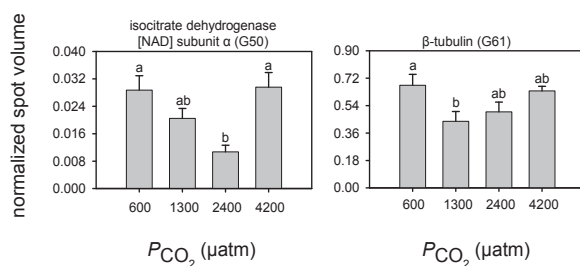


Fig. S2: continued

nMDS and ANOSIM (Fig. 5 and Tab. 3) indicated that some groups are overlapping in both tissues ($R > 0.5, < 0.75$). However, differences in protein abundances between control P_{CO_2} and elevated P_{CO_2} are low in mantle (max. $R = 0.533$) and in gill tissue (max. $R = 0.321$).

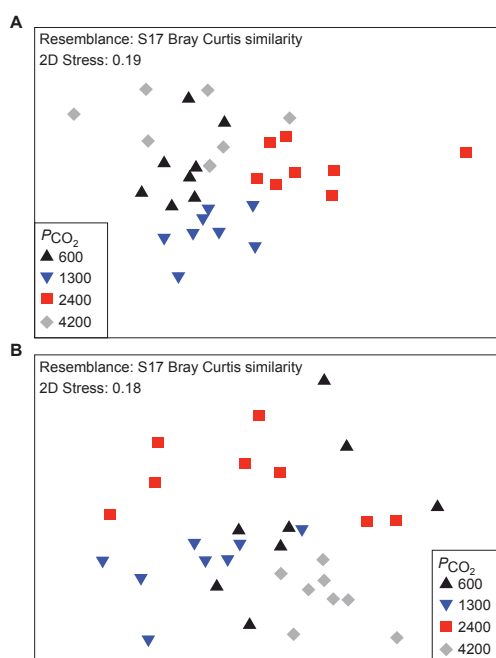


Fig. 5: Non-metric multi-dimensional scaling (nMDS) of mantle (A) and gill tissue (B).

Tab. 3: Results of ANOSIM pairwise tests between the four P_{CO_2} level. Numbers display the R statistics, values in brackets denote the significance level in %.

	600	1300	2400
Mantle			
1300	0.312 (0.4)		
2400	0.533 (0.1)	0.62 (0.1)	
4200	0.232 (0.5)	0.441 (0.1)	0.453 (0.1)
Global R	0.427		
Gill			
1300	0.27 (0.5)		
2400	0.238 (2.3)	0.392 (0.4)	
4200	0.321 (0.1)	0.624 (0.2)	0.583 (0.2)
Global R	0.409		

Discussion

In this study we assessed the impacts of long-term (one year) seawater acidification on *M. edulis* ecophysiology. We monitored growth, calcification, metabolism and ammonium excretion to construct a basic energy budget of animals acclimated to elevated CO_2 . Further, we analyzed tissue samples from these animals using proteomic approaches to develop hypotheses of how long-term elevated P_{CO_2} acts as a modulator of processes on the cellular level.

Energy budget

Mussels were able to grow and calcify rapidly under the experimental conditions, increasing in shell length from <0.5 mm to >20 mm within one year. Both shell length (by 7 %) and shell mass (by 24%) growth were significantly reduced at the highest seawater P_{CO_2} but were not significantly different from controls at intermediate P_{CO_2} . Similar reductions in shell growth and calcification were obtained for the same *M. edulis* population following an 8-week acclimation period to comparable P_{CO_2} -levels (Thomsen and Melzner, 2010; Thomsen et al., 2010). This is the first study to acclimate bivalves for more than one year to elevated P_{CO_2} . Recent studies indicated that, in some cases, full acclimatization of marine invertebrates to high CO_2 requires long time intervals of months to years (Dupont et al., 2013). It has been shown that long-term acclimation to elevated P_{CO_2} can induce shifts of the cellular energy budgets in order to match higher ion regulatory demand (Deigweier et al., 2010). While we have not quantified energy investment into specific cellular processes, long-term acclimation does not appear to favor elevated metabolic rates. Metabolic rates of one-year acclimated mussels were not significantly affected by P_{CO_2} , albeit it needs to be noted that variability between replicates was high. Previous studies, using juvenile and adult bivalves acclimated for 5 days to 20 weeks to elevated P_{CO_2} , found metabolic reductions at moderate and high P_{CO_2} (750-5000 μatm ; Michaelidis et al., 2005; Navarro et al., 2013; Liu and He, 2012), yet unaltered (1500-3790 μatm ; Fernandez-Reiriz et al., 2012; Liu and He, 2012; Lannig et al., 2010) or slightly elevated metabolic rates (1120-3500 μatm ; Thomsen and Melzner, 2010; Beniash et al., 2010), demonstrating the variability in effects of elevated P_{CO_2} on metabolic rates.

Elevated ammonium excretion has been suggested to function as a mechanism to excrete acid equivalents in mytilid mussels (Lindinger et al., 1984). While *M. edulis* acclimated to elevated P_{CO_2} for one year were not characterized by significant increases in rates of ammonium excretion (Fig. 2C), ammonium excretion increased in a dose-dependent manner in animals from the same population following an acclimation phase of eight weeks to P_{CO_2} levels ranging from 385 to 4000 μatm (Thomsen and Melzner, 2010). Furthermore, an increase in ammonium excretion has, for example, been observed during short-term exposure of *Mytilus* sp. to acidified seawater (*M. edulis*, 2 days, Lindinger et al., 1984; *M. galloprovincialis*, <1day, Michaelidis et al., 2005), suggesting that distinct modulations in ammonium excretion are

temporary responses occurring during the early phase (days to several weeks) of acclimation to elevated P_{CO_2} . The observed differences in the strength of increase in ammonium excretion between the one-year experiment and the 8-week-incubation might also be related to the different seasons, in which the experiments ended (one-year: summer, 8-week: winter). It could be shown that food ingestion rates of *M. edulis* were low during summer times, but nitrogen utilization and protein synthesis highest; a reduced excretion of nitrogen was thus discussed as a mechanism to conserve nitrogen stores (Kreeger et al., 1995).

In our experiment, scope for growth was reduced linearly at a rate of $0.7 \text{ J h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ per $100 \text{ } \mu\text{atm}$. The main reason for the observed decline in scope for growth was the reduction of clearance rates, which resulted in decreased food uptake. This is in line with results of Navarro et al. (2013) who measured a reduction in absorption rates and absorption efficiencies as well as in oxygen consumption, collectively leading to a reduced scope for growth in the mussel *M. chilensis* acclimated for 10 weeks to CO_2 partial pressures of 750 and $1200 \text{ } \mu\text{atm}$. The reasons for declining clearance rates remain unclear. Elevated P_{CO_2} could affect food capture by the gill through reduced mucus production or through altered expression of lectins in the feeding organs (Espinosa and Allam, 2013). A reduction of ciliary activity in isolated *M. edulis* gills in response to reduced pH has only been observed at values far below the predicted near-future pH (pH 3.7-6.9, Haywood, 1925). Downstream from the capture of food particles, digestion and absorption of nutrients may be affected by pH. For example, the function of pH sensitive digestive enzymes might be impaired and could cause decreased rates of digestion, as recently demonstrated for larval echinoderms (Stumpp et al., 2013). In this case, reduced clearance rates might be a secondary effect to avoid accumulation of undigested food particles in the stomach. Reduced filtration rates at too high algal concentration have already been observed in mussels (Riisgård, 1991). The author suggested that a reduced filtration rate was thus related to satiation of the digestive system. A third alternative is that mussels may favor energy budget re-allocation scenarios that do not rely on elevated routine metabolic rates, but rather on decreased rates of food assimilation and body mass accretion. It is interesting that largely unaltered metabolic rates and decreased feeding rates in response to similar scenarios of simulated ocean acidification have also been observed in adult sea urchins (Stumpp et al., 2012) and sea stars (Appelhans, 2012 dissertation).

Tissue-specific responses towards elevated P_{CO_2} - proteomics

On the proteomic level, we chose to investigate the outer mantle (mantle margin with the mantle folds), as this tissue is secreting the organic and inorganic components - organic matrix, calcium carbonate and the periostracum - of the shell (e.g. Beedham, 1958; Suzuki et al., 2009; Weiss et al., 2006; Addadi et al., 2006; Levi-Kalisman et al., 2001). Gill tissue was isolated for proteomic analysis since it is a metabolically active tissue and vital for filtration and

feeding. As we witnessed reduced scope for growth and decreased calcification rates, caused obviously by reduced clearance rates, we hypothesized to find changes in protein abundance patterns within the proteomes of the tissues responsible for calcification and filtration.

The proteomic analysis of mantle and gill tissue from the present long-term experiment revealed changes in abundance in only few proteins. We could show that 8% of all separated proteins from mantle and gill tissue were affected significantly in their abundances. According to ANOSIM the treatment groups were not completely different ($R < 0.75$). Both, the detected magnitude of changes in protein abundance and the numbers of proteins that changed were lower in comparison to the proteomic responses of gill and mantle tissue to chronic (7, 13 and 19°C (Fields et al., 2012)) and acute temperature exposure (13, 24, 28 and 31°C (Tomanek and Zuzow, 2010)) and osmotic stress (24.5, 29.8 and 35.0 psu (Tomanek et al., 2012) in *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* using the same methodology.

The fraction of affected proteins in our study is comparable to findings from other studies that investigated impacts of acidification on proteomes of marine invertebrates: abundance of 1.6% of the proteins detected in response to a four-day incubation in acidified seawater (pH 7.6, approx. 1200 μatm) was changed more than 1.5-fold in larvae of the intertidal crustacean *Balanus amphitrite* (Wong et al., 2011). Elevated P_{CO_2} (approx. 2300 μatm) led to a decrease of 18% of the proteins detected under control conditions in larval oysters, *Crassostrea gigas* (Dineshram et al., 2012). Our values are close to the number of changed proteins (12%) observed in oyster *C. gigas* mantle tissue in response to a two-week acclimation to a P_{CO_2} of approx. 3500 μatm (Tomanek et al., 2011).

Mantle tissue

In the present experiment, abundance of several cytoskeletal proteins (tubulin, actin, tektin, intermediate filament) was altered at elevated P_{CO_2} in mantle tissue. For example, three tubulin isoforms (M25, 26 and 28) were least abundant at 2400 μatm , and two of the three (M25 and 26) significantly increased at 4200 μatm (Fig. S1). Abundances of two actin isoforms changed in response to hypercapnia in mantle, with peak levels at either 2400 or 4200 μatm (Fig. S1). In a previous study on oyster mantle, elevated P_{CO_2} also increased actin abundance (Tomanek et al., 2011). In oyster mantle tissue, a number of oxidative stress proteins, mainly peroxiredoxins, changed concomitantly with actins. Thus it was hypothesized, that actins from oyster mantle were possibly modified by reactive oxygen species (Tomanek et al., 2011). The identification of an aldehyde reductase in mantle and the fact that it clustered with one of the β -actins (Fig. 4A) can also suggest that aldehydes may modify the cytoskeleton in *Mytilus* mantle, however, the hypothesis is much more tenuous in the present study compared to oyster mantle (Tomanek et al., 2011), given that we only identified one oxidative stress protein.

A mantle protein containing a vWFA domain (M14, Fig. S1) was characterized by highest abundance at 2400 μatm (2-7-times higher compared to the other P_{CO_2} -levels). This domain can be found in extracellular matrix proteins like matrilins and collagens (Hohenester and Engel, 2002), but also in the shell matrix protein Pif, which regulates nacre formation (Suzuki et al., 2009, 2013). However, protein searches on public databases revealed at least low similarities with matrilin. Matrilin 2, which is expressed in mantle tissue of the freshwater pearl mussel *Hyriopsis cumingii*, has been speculated to be potentially involved in pearl formation (Bai et al., 2010). Another extracellular matrix protein, collagen, is also characterized by changes in abundances in the mantle tissue. Collagen is directly involved in vertebrate calcification, as it is a component of e.g. bone, dentin and tendon and was suggested to catalyze the precipitation of mineral *in-vitro* (Katz und Li, 1973). Thus, collagen was later defined as “template for mineral deposition” (Boskey, 2002). For example, complexes of osteonectin and type I collagen from bovine bones bind synthetic apatite crystals and free calcium ions, whereas osteonectin alone was not able to promote mineral phase precipitation (Termine et al., 1981). Additionally, collagen was shown to induce the oriented nucleation of apatite (Nudelman et al., 2010). The involvement of collagen in invertebrate calcification is still not clear. However, the organic matrix of nacre of the marine snail *Haliotis laevigata* consists of filaments, which the authors suggested to be collagen based on the diameter of the filaments (Blank et al., 2003). Although a function in biomineralization cannot yet be attributed to collagen, the high abundance of collagen mRNA in the mantle transcriptome of the abalone *Haliotis asinina* led to the assumption that collagen is involved in nacre formation (Jackson et al., 2010). *In-vitro* studies revealed that increasing collagen concentrations can inhibit calcite formation (Shen et al., 2002) and that collagen *in-vitro* has a promotional effect on magnesium ions in controlling the polymorph of CaCO_3 crystals (Jiao et al., 2006). However, the observed changes in extracellular matrix proteins do not correlate well with a reduction in calcification rate exclusively at high P_{CO_2} .

In a previous study, we assessed gene expression changes in the mantle tissue (marginal/pallial and central) of *M. edulis* that were acclimated to different P_{CO_2} (385-4000 μatm) for two months. Within that data set, just a few genes putatively involved in biomineralization changed in expression (Hüning et al., 2013), which is comparable to the low number of affected proteins in this study. The most relevant change in gene expression was an increased expression of a tyrosinase transcript potentially involved in the tanning of the organic periostracum, which covers the shell and prevents corrosion of shell CaCO_3 (Hüning et al., 2013).

In mantle tissue the abundance of a peptidyl-prolyl isomerase (M43, Fig. S1) was increased more than 2-fold at a P_{CO_2} of 1300 μatm . The enhanced abundance of peptidyl-prolyl isomerase in *M. edulis* may be related to an increase in protein-folding and thus a generation of

more functional proteins to meet alterations in demand under moderately elevated P_{CO_2} . Cyclophilins, which are characterized by peptidyl-prolyl isomerase activity (Fischer et al., 1989; Wang and Heitman, 2005), are expressed in biomineralizing cells of sea urchin (Amore and Davidson, 2006; Livingston et al., 2006) and in mantle regions responsible for nacre formation of the bivalve *Pinctada maxima* and the gastropod *Haliotis asinina* (Jackson et al., 2010), suggesting an involvement in calcification. Furthermore, a protein similar to cyclophilin was detected in the shell matrix of the snail *Lottia gigantea* (Marie et al., 2013).

Gill tissue

In gill tissue we identified four tubulin isoforms and one actin (Fig. S2). Two of these tubulins (G15 and G17) showed highest abundances at 1300 μatm , while the other two (G60 and G61) showed the lowest abundance at this P_{CO_2} -level. These contrasting abundance patterns suggest that these isoforms differ in their post-translational modification (PTM). A number of PTM are known for tubulins, e.g. detyrosination, acetylation, polyglutamylation, polyglycylation, all of which affect their function (Garnham and Roll-Mecak, 2012; Janke and Bulinski, 2011). Tubulins are not only major building blocks of cilia in gills (so is the radial spoke head protein 9), where they function in cilia movement facilitating particle transport for feeding, delivery of mucus and generation of the water stream that enables filtration and gas exchange. They also play an important role in membrane transport pathways (Cole and Lippincott-Schwartz, 1995).

Two isoforms of α -amino adipic semialdehyde dehydrogenase (ALDH) increased moderately in abundance at 2400 μatm (G14 and G20, Fig. S1 and Fig. 4B). This specific ALDH is directly involved in the degradation and biosynthesis of lysine (Salway, 2004) but may also play a role in scavenging reactive aldehydes and carbonyls that arise from lipid peroxidation during oxidative stress (Ellis, 2007; Brocker et al., 2011). The abundance of mitochondrial aldehyde dehydrogenase in *M. trossulus* and *M. galloprovincialis* was also altered during acclimation to cold temperatures (Fields et al., 2012), supposedly due to higher levels of peroxidation of polyunsaturated fatty acids. Additionally, the abundance of a DyP-type peroxidase, which functions as a catalase to scavenge hydrogen peroxide (Sugano, 2009) was highest under 2400 μatm . Although proteins involved in oxidative stress responses were affected by long-term elevated P_{CO_2} in the present study, the number of affected proteins and the magnitude of change in abundance was not as pronounced as following acute and chronic heat and hypo-saline stress in *Mytilus* sp. (Fields et al., 2012; Tomanek and Zuzow, 2010; Tomanek et al., 2012) or following short-term acclimation of oysters to elevated P_{CO_2} (Tomanek et al., 2011).

Abundance levels of the extracellular signal-regulated kinase ERK2 (G39, Fig. S2) decreased with increasing P_{CO_2} (max. reduction to 0.84). ERK2 is part of the MAP kinase signal

transduction cascade functioning in a variety of processes like e.g. cell migration/survival, metabolism, differentiation and transcription (Roskoski, 2012). ERK was found activated by H_2O_2 in *M. galloprovincialis* gill extracts (Chatel et al., 2010), and its activation promotes cell survival of human cells during oxidative stress (Wang et al., 1998), but might also contribute to enhanced apoptosis (Lee et al., 2003; Zhuang and Schnellmann, 2006). The decrease in abundance of ERK2 may reduce the possibility of ERK phosphorylation and thereby cause a decrease of activated kinase. Similarly, ERK2 abundance decreased at a heat shock inducing temperature in heat-sensitive *M. trossulus* (Tomanek and Zuzow, 2010). A target of the ERK2 signaling cascade is the cytoskeleton (Kolch, 2005), suggesting a link with the abundance changes of cytoskeletal proteins.

The abundance of proteins functioning in protein degradation (two proteasome subunits) was reduced with elevated P_{CO_2} in gill tissue (G06: reduction to max. 0.68 and G47: reduction to max. 0.82). The 26S proteasome consists of two sub-complexes, a 20S core particle and a 19S regulatory particle, and is responsible for degradation of ubiquitin-conjugated proteins (Tanaka et al., 2012). The regulatory subunit recognizes polyubiquitinated proteins and channels them into the core particle responsible for proteolysis (Tanaka et al., 2012). In this study, the non-ATPase regulatory subunit 14 (Rpn11) from the regulatory part of the proteasome responsible for deubiquitination (Tanaka et al., 2012; Verma et al., 2002) together with the α subunit 5 from the core part of the proteasome decreased in response to elevated P_{CO_2} . This indicates a tight interaction of both particles, as was illustrated previously (Tonoki et al., 2009). Interestingly, we could also detect a protein containing a WD40 repeat domain. This domain is e.g. part of E3 ubiquitin ligase complexes (Tyers and Willems, 1999), which function in transferring ubiquitins to proteins assigned for proteolysis. Together, reduced abundances in these three proteins suggest a down-regulation of protein degradation with elevated P_{CO_2} and thus a possible reduction in protein turnover.

Changes in proteasome abundance can also affect the abundance of other proteins. In human umbilical cord vein cells inhibition of the proteasome led to an induction of prohibitin (Bieler et al., 2009), a mitochondrial chaperone. Contrary to these results, the abundance of prohibitin in *M. edulis* gills was lower at 1300 μatm , when proteasome abundance was decreased. Knock-down of prohibitin in endothelial cells has been described to inhibit complex I of the respiratory chain with a concomitant increase of reactive oxygen species (Schleicher et al., 2008). For the same *M. edulis* population a decrease in expression of transcripts involved in aerobic ATP synthesis was measured in pallial/marginal mantle tissue under moderate P_{CO_2} (1120 and 2400 μatm) and was discussed to indicate a shift towards enhanced capacity of anaerobic metabolic pathways (Hüning et al., 2013). Here, reduced abundance of NAD-isocitrate dehydrogenase at moderate P_{CO_2} could underline a switch towards a higher capacity of anaerobic metabolism.

Conclusion

Here, we describe the impacts of chronic seawater acidification on whole animal physiology (metabolism, ammonium excretion and growth) and on differential protein abundance patterns from mantle and gill tissue of the blue mussel after one year of exposure. The most apparent impacts on the physiological level were a reduction in shell growth at 4200 μatm and a P_{CO_2} dependent linear decrease in clearance rate, which caused a decline in scope for growth. The reductions in shell length and shell mass growth from this experiment are comparable in magnitude to the reduced calcification rate measured in the same population following a shorter incubation period of 8 weeks (Thomsen et al., 2010).

While mytilid larvae are quite sensitive to ocean acidification (Gazeau et al., 2010), post settlement mussels in the Western Baltic are relatively tolerant to ocean acidification scenarios, probably due to their routine exposure to natural fluctuations in seawater carbonate chemistry (Thomsen et al., 2013). Tolerance is enabled at the expense of reduced growth performance. Proteomic analysis of mantle and gill tissue revealed that the abundance of several distinct protein groups was altered, with cytoskeletal elements, extracellular matrix components, oxidative stress proteins and proteins involved in protein degradation being the major functional categories. Although long-term elevated P_{CO_2} levels seem to have a limited effect on the mantle and gill proteome of settled mussels, as just a small number of proteins changed their abundances, it is obvious that ocean acidification will alter important physiological processes in mussel tissues.

It remains to be investigated, whether early life-stages of mussels, which are suggested to be most vulnerable to elevated P_{CO_2} , are able to modify their proteome and physiological processes under ocean acidification in similar ways. Additionally, the effects demonstrated here by use of the combined physiological and proteomic approach need to be investigated in other *Mytilus* sp. populations that are not temporarily exposed to reduced seawater pH. In this way, possible local adaptations and their genetic and epigenetic manifestation, respectively, could be differentiated. This will allow for more reliable projections with respect to the time frame of possible adaptations compared to the rapid ongoing climate change.

List of symbols and abbreviations

ANOSIM	analysis of similarity
ANOVA	analysis of variance
ATP	adenosine triphosphate
CaCO ₃	calcium carbonate
ERK	extracellular signal-regulated kinase
IPG	immobilized pH gradient
MAM	meprin, A-5 protein, and receptor protein-tyrosine phosphatase mu
MAP	mitogen-activated protein
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
NBS	National Bureau of Standards
NH ₄ ⁺	ammonium
nMDS	non-metric multi-dimensional scaling
SFDM	shell free dry mass
TCA	trichloroacetic acid
vWFA	von Willebrand factor type A domain
WD40	40 amino acid motif, often terminating in a trp-aspartate (W-D) dipeptide

Acknowledgement

We would like to thank Ulrike Panknin for monitoring the incubation systems, measuring the water chemistry parameters as well as for helping with the dissection of the mussels.

Funding

This study is part of the German joint project “Biological Impacts of Ocean Acidification (BIOACID)” (3.1.3) funded by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF, FKZ 03F0608B). It is associated with the PACES research program (work package 1.6) of the Alfred Wegener Institute funded by the Helmholtz Association. Additionally, the study was financially supported by the Helmholtz Graduate School for Polar and Marine Research (POLMAR) and by National Science Foundation grant EF 1041227 awarded to L.T.

Author contribution

The study was designed by A.K.H., J.T., M.L., L.T. and F.M. Data were collected by A.K.H., J.T., M.J.Z., J.S., F.M. and U.F. and analyzed by A.K.H., J.T., L.T. and F.M. The manuscript was written by A.K.H., L.T. and F.M., all other authors commented on the manuscript.

Author competing interests

No competing interests declared.

References

- Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F., Weiner, S. (2006). Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chem Eur J* 12, 980-987.
- Amore, G., Davidson, E. H. (2006). *cis*-Regulatory control of cyclophilin, a member of the ETS-DRI skeletogenic gene battery in the sea urchin embryo. *Dev Biol* 293, 555-564.
- Andersen, S., Grefsrud, E. S., Harboe, T. (2013). Effect of increased $p\text{CO}_2$ on early shell development in great scallop (*Pecten maximus* Lamarck) larvae. *Biogeosci Discuss* 10, 3281-3310. DOI:10.5194/bgd-10-3281-2013
- Appelhans, Y. S. (2012). Benthic interactions in a high CO_2 -world. Dissertation, Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany.
- Bai, Z., Yin, Y., Hu, S., Wang, G., Zhang, X., Li, J. (2010). Identification of genes potentially involved in pearl formation by expressed sequence tag analysis of mantle from freshwater pearl mussel (*Hyriopsis Cumingii* Lea). *J Shellfish Res* 29(2), 527-534.
- Beedham, G. E. (1958). Observations on the mantle of the lamellibranchia. *Q J Microsc Sci* s3-99(46), 181-197.
- Beniash, E., Ivanina, A., Lieb, N. S., Kurochkin, I., Sokolova, I. M. (2010). Elevated level of carbon dioxide affects metabolism and shell formation in oysters *Crassostrea virginica*. *Mar Ecol Prog Ser* 419, 95-108.
- Bieler, S., Meiners, S., Stangl, V., Pohl, T., Stangl, K. (2009). Comprehensive proteomic and transcriptomic early induction of a protective anti-oxidative stress response by low-dose proteasome inhibition. *Proteomics* 9, 3257-3267.
- Blank, S., Arnoldi, M., Khoshnavaz, S., Treccani, L., Kuntz, M., Mann, K., Grathwohl, G., Fritz, M. (2003). The nacre protein perlucin nucleates growth of calcium carbonate crystals. *J Microsc* 212, 280-291.
- Boskey, A. L. (2002). Pathogenesis of cartilage calcification: mechanisms of crystal deposition in cartilage. *Curr Rheumatol Rep* 4, 245-251.
- Briffa, M., de la Haye, K., Munday, P. L. (2012). High CO_2 and marine animal behavior: Potential mechanisms and ecological consequences. *Mar Pollut Bull* 64, 1519-1528.
- Brocker, C., Cantore, M., Failli, P., Vasiliou, V. (2011). Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) attenuates reactive aldehyde and oxidative stress induced cytotoxicity. *Chem-Biol Interact* 191, 269-277.
- Caldeira, K., Wickett, M. E. (2005). Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *J Geophys Res* 110, C09S04, doi:10.1029/2004JC002671.
- Campanale, J. P., Tomanek, L., Addams, N. L. (2011). Exposure to ultraviolet radiation causes proteomic changes in embryos of the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *J Exp Mar Biol Ecol* 397, 106-120.

- Chatel, A., Hamer, B., Talarmin, H., Dorange, G., Schroder, H. C. and Muller, W. E. (2010). Activation of MAP kinase signaling pathway in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarker of environmental pollution. *Aquat Toxicol* 96, 247-55.
- Clark, K.R., Gorley, R. N. (2001). PRIMER v5: User manual/tutorial, PRIMER-E, Plymouth UK.
- Cole, N. B., Lippincott-Schwartz, J. (1995). Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr Opin Cell Biol* 7(1), 55-64.
- Deigweiher, K., Hirse, T., Bock, C., Lucassen, M., Pörtner, H.-O. (2010). Hypercapnia induced shifts in gill energy budgets of Antarctic notothenoids. *J Comp Physiol B* 180(3), 347-359.
- Dineshram, R., Wong, K. K. W., Xiao, S., Yu, Z., Yuan Qian, P., Thiagarajan, V. (2012). Analysis of Pacific oyster larval proteome and its response to high-CO₂. *Mar Pollut Bull* 64(10), 2160-2167.
- Dupont, S., Dorey, N., Stumpp, M., Melzner, F. Thorndyke, M. (2013). Long-term and trans-life-cycle effects of exposure to ocean acidification in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Mar Biol* 160, 1835-1843
- Elliott, J. M., Davison, W. (1975). Energy equivalents of oxygen-consumption in animal energetics. *Oecologia* 19, 195-201.
- Ellis, E. M. (2007). Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutic intervention. *Pharmacol Therapeut* 115, 13-24.
- Espinosa, E. P., Allam, B. (2013). Food quality and season affect gene expression of the mucosal lectin MeML and particle sorting in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 160, 1441-1450.
- Feely, R. A., Doney, S. C., Cooley, S. R. (2009). Ocean acidification: present conditions and future changes in a high-CO₂ world. *Oceanography* 22(4), 36-47.
- Feely, R. A., Sabine, C. L., Hernandez-Ayon, J. M., Ianson, D., Hales, B. (2008). Evidence for upwelling of corrosive “acidified” water onto the continental shelf. *Science* 320, 1490-1492.
- Fernandez-Reiriz, M. J., Range, P., Alvarez-Salgado, X. A., Espinosa, J., Labarta, U. (2012). Tolerance of juvenile *Mytilus galloprovincialis* to experimental seawater acidification. *Mar Ecol Prog Ser* 454, 65-74.
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kieffhaber, T., Schmid, F. X. (1989). Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337, 476-478.
- Fields, P. A., Zuzow, M. J., Tomanek, L. (2012). Proteomic responses of blue mussel (*Mytilus*) congeners to temperature acclimation. *J Exp Biol* 215, 1106-1116.
- Garnham, C. P., Roll-Mecak, A. (2012). The chemical complexity of cellular microtubules: tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions. *Cytoskeleton (Hoboken)* 69, 442-63.
- Gaylord, B., Hill, T. M., Sanford, E., Lenz, E. A., Jacobs, L. A., Sato, K. N., Russell, A. D., Hettinger, A. (2011). Functional impacts of ocean acidification in an ecologically critical foundation species. *JEB* 214, 2586-2594.

Gazeau, F., Gattuso, J.-P., Dawber, C., Pronker, A. E., Peene, F., Peene, J., Heip, C. H. R., Middelburg, J. J. (2010). Effect of ocean acidification on the early life stages of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biogeosciences* 7, 2051-2060.

Grzelak, K., Kuklinski, P. (2010). Benthic assemblages associated with rocks in brackish environment of the southern Baltic Sea. *J Mar Biol Assoc Uk* 90(1), 115-124.

Haywood, C. (1925). The relative importance of pH and carbon dioxide tension in determining the cessation of ciliary movement in acidified sea water. *J Gen Physiol* 7(6), 693-697.

Hohenester, E., Engel, J. (2002). Domain structure and organization in extracellular matrix proteins. *Matrix Biol* 21, 115-128.

Holmes, R. M., Aminot, A., K  rouel, R., Hooker, B. A., Peterson, B. J. (1999). A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Can J Fish Aquat Sci* 56, 1801-1808.

Hüning, A. K., Melzner, F., Thomsen, J., Gutowska, M. A., Krämer, L., Frickenhaus, S., Rosenstiel, P., Pörtner, H.-O., Philipp, E. E. R., Lucassen, M. (2013). Impacts of seawater acidification on mantle gene expression patterns of the Baltic Sea blue mussel: implications for shell formation and energy metabolism. *Mar Biol* 160, 1845-1861.

IPCC (2007) The fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, USA.

Jackson, D. J., McDougall, C., Woodcroft, B., Moase, P., Rose, R. A., Kube, M., Reinhardt, R., Rokhsar, D. S., Montagnani, C., Joubert, C., Piquemal, D., Degnan, B. M. (2010). Parallel evolution of nacre building gene sets in molluscs. *Mol Biol Evol* 27(3), 591-608.

Janke, C., Bulinski, J. C. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Cell Biol* 12(12), 773-786.

Jiao, Y., Feng, Q., Li, X. (2006). The co-effect of collagen and magnesium on calcium carbonate biomineralization. *Mater Sci Eng C* 26(4), 648-652.

Katz, E. P., Li, S.-T. (1973). Structure and function of bone collagen fibrils. *J Mol Biol* 80, 1-15.

Kiørboe, T., M  hlenberg, F., Nøhr, O. (1981). Effect of suspended bottom material on growth and energetics in *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 61, 283-288.

Koivisto, M. E., Westerborn, M. (2010). Habitat structure and complexity as determinants of biodiversity in blue mussel beds on sublittoral rocky shores. *Mar Biol* 157, 1463-1474.

Kolch, W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 827-37.

Kreeger, D. A., Hawkins, A. J. S., Bayne, B. L., Lowe, D. M. (1995). Seasonal variation in the relative utilization of dietary protein for energy and biosynthesis by the mussel *Mytilus edulis*. *Mar Ecol Prog Ser* 126, 177-184.

Kroeker, K. J., Kordas, R. L., Crim, R. N., Singh, G. G. (2010). Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecol Lett* 13, 1419-1434.

Kurihara, H., Asai, T., Kato, S., Ishimatsu, A. (2008). Effects of elevated pCO₂ on early development in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Biol* 4, 225-233.

- Langenbuch, M., Bock, C., Leibfritz, D., Pörtner, H.-O. (2006). Effects of environmental hypercapnia on animal physiology: a ^{13}C NMR study of protein synthesis rates in the marine invertebrate *Sipunculus nudus*. *Comp Biochem Physiol A* 144, 479-484.
- Lannig, G., Eilers, S., Pörtner, H.-O., Sokolova, I., Bock, C. (2010). Impact of ocean acidification on energy metabolism of oyster, *Crassostrea gigas* – changes in metabolic pathways and thermal response. *Mar Drugs* 8, 2318-2339.
- Lauff, R. F., Wood, C. H. (1996). Respiratory gas exchange, nitrogenous waste excretion, and fuel usage during aerobic swimming in juvenile rainbow trout. *J Comp Physiol B* 166, 501-509.
- Lee, Y.-J., Cho, H.-N., Soh, J.-W., Jhon, G. J., Cho, C.-K., Chung, H.-Y., Bae, S., Lee, S.-J., Lee, Y.-S. (2003). Oxidative stress-induced apoptosis is mediated by ERK1/2 phosphorylation. *Exp Cell Res* 291, 251-266.
- Levi-Kalishman, Y., Falini, G., Addadi, L., Weiner, S. (2001). Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using cryo-TEM. *J Struct Biol* 135, 8-17.
- Lewis E., Wallace D. W. R. (1998) Program developed for CO₂ system calculations. Oak Ridge, Oak Ridge National Laboratory ORNL/CDIAC-105.
- Lindinger, M. I., Lauren, D. J., McDonald, D. G. (1984). Acid-base balance in the sea mussel, *Mytilus edulis*. III. Effects of environmental hypercapnia on intra-and extracellular acid-base balance. *Mar Biol Lett* 5, 371-381.
- Lintas, C., Seed, R. (1994). Spatial variation in the fauna associated with *Mytilus edulis* on a wave-exposed rocky shore. *J Moll Stud* 60, 165-174.
- Liu, W., He, M. (2012). Effects of ocean acidification on the metabolic rates of three species of bivalve from southern coast of China. *Chin J Oceanol Limnol* 30(2), 206-211.
- Livingston, B. T., Killian, C. E., Wilt, F., Cameron, A., Landrum, M. J., Ermolaeva, O., Sapojnikov, V., Maglott, D. R., Buchanan, A. M., Etensohn, C. A. (2006). A genome-wide analysis of biomineralization-related proteins in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* 300, 335-348.
- McDonagh, B., Sheehan, D. (2007). Effects of oxidative stress on protein thiols in the blue mussel *Mytilus edulis*: proteomic identification of target proteins. *Proteomics* 7, 3395-3403.
- Marie, B., Jackson, D. J., Ramos-Silva, P., Zanella-Cléon, I., Guichard, N., Marin, F. (2013). The shell-forming proteome of *Lottia gigantea* reveals both deep conservations and lineage-specific novelties. *FEBS Journal* 280, 214-232.
- Melzner, F., Gutowska, M. A., Langenbuch, M., Dupont, S., Lucassen, M., Thorndyke, M. C., Bleich, M., Pörtner, H.-O. (2009). Physiological basis for high CO₂ tolerance in marine ectothermic animals: pre-adaptation through lifestyle and ontogeny? *Biogeosciences* 6, 2313-2331.
- Melzner, F., Thomsen, J., Koeve, W., Oeschlies, A., Gutowska, M. A., Bange, H. W., Hansen, H. P., Körtzinger A. (2013). Future ocean acidification will be amplified by hypoxia in coastal habitats. *Mar Biol* 160, 1875-1888.

- Michaelidis, B., Ouzounis, C., Paleras, A., Pörtner, H.-O. (2005). Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Ecol Prog Ser* 293, 109-118.
- Monsinjon, T., Andersen, O. K., Leboulenger, F., Knigge, T. (2006). Data processing and classification analysis of proteomic changes: a case study of oil pollution in the mussel, *Mytilus edulis*. *Proteome Science* 4, 17, doi:10.1186/1477-5956-4-17.
- Munday, P. L., McCormick, M. I., Nilsson, G. E. (2012). Impact of global warming and rising CO₂ levels on coral reef fishes: what hope for the future? *J Exp Biol* 215, 3865-3873.
- Navarro, J. M., Torres, R., Acuna, K., Duarte, C., Manriquez, P. H., Lardies, M., Lagos, N. A., Vargas, C., Aguilera, V. (2013). Impact of medium-term exposure to elevated pCO₂ levels on the physiological energetics of the mussel *Mytilus chilensis*. *Chemosphere* 90(3), 1242-1248.
- Norling, P., Kautsky, N. (2007). Structural and functional effects of *Mytilus edulis* on diversity of associated species and ecosystem functioning. *Mar Ecol Prog Ser* 351, 163-175.
- Nudelman, F., Pieterse K., George, A., Bomans, P. H. H., Friedrich, H., Brylka, L. J., Hilbers, P. A. J., de With, G., Sommerdijk, N. A. J. M. (2010). The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nat Mater* 9(12), 1004-1009.
- Philipp, E. E. R., Kraemer, L., Melzner, F., Poustka, A. J., Thieme, S., Findeisen, U., Schreiber, S., Rosenstiel, P. (2012). Massively parallel RNA sequencing identifies a complex immune gene repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLoS ONE* 7(3): e33091. doi:10.1371/journal.pone.0033091
- Pörtner, H.-O. (2008). Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Mar Ecol Prog Ser* 373, 203-217.
- Range, P., Piló, D., Hamadou-Ben, R., Chicharo, M. A., Matias, D., Joaquim, S., Oliveira, A. P., Chicharo, L. (2012). Seawater acidification by CO₂ in coastal lagoon environment: Effects on life history traits of juvenile mussels *Mytilus galloprovincialis*. *J Exp Mar Biol Ecol* 424-425, 89-98.
- Riisgård, H. U. (1991). Filtration rate and growth in the blue mussel *Mytilus edulis* Linnaeus 1758 dependence on algal concentration. *J Shellfish Res* 10(1), 29-36.
- Riisgård, H. U., Randløv, A. (1981). Energy budgets, growth and filtration rates in *Mytilus edulis* at different algal concentrations. *Mar Biol* 61, 227-234.
- Rodolfo-Metalpa, R., Houlbrèque, F., Tambutté, É., Boisson, F., Baggini, C., Patti, F. P., Jeffree, R., Fine, M., Foggo, A., Gattuso, J.-P., Hall-Spencer, J. M. (2011). Coral and mollusc resistance to ocean acidification adversely affected by warming. *Nat Clim Change* 1, 308-312.
- Roskoski Jr., R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66(2), 105-143.
- Roy, R. N., Roy, L. N., Vogel, K. M., Porter-Moore, C., Pearson, T., Good, C. E., Millero, F. J., Campbell, D. M. (1993). The dissociation constants of carbonic acid in seawater at salinities 5 to 45 and temperatures 0 to 45° C. *Mar Chem* 44, 249-267.
- Sabine, C. L., Feely, R. A., Gruber, N., Key, R. M., Lee, K., Bullister, J. L., Wanninkhof, R., Wong, C. S., Wallace, D. W. R., Tilbrook, B., Millero, F. J., Peng, T.-H., Kozyr, A., Ono, T., Rios, A. F. (2004). The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science* 305, 367-371.

- Salonen, K., Sarvala, J., Hakala, I., Viljanen, M.-L. (1976). The relation of energy and organic carbon in aquatic invertebrates. *Limnol Oceanogr* 21(5), 724-730.
- Salway, J. G. (2004). *Metabolism at a Glance*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Schleicher, M., Shepherd, B. R., Suarez, Y., Fernandez-Hernando, C., Yu, J., Pan, Y., Acevedo, L. M., Shadel, G. S., Sessa, W. C. (2008). Prohibitin-1 maintains the angiogenic capacity of endothelial cells by regulating mitochondrial function and senescence. *J Cell Biol* 180(1), 101-112.
- Shen, F. H., Feng, Q. L., Wang, C. M. (2002). The modulation of collagen on crystal morphology of calcium carbonate. *J Cryst Growth* 242, 239-244.
- Silvestre, F., Gillardin, V., Dorts, J. (2012). Proteomics to assess the role of phenotypic plasticity in aquatic organisms exposed to pollution and global warming. *Integr Comp Biol* 52(5), 681-694.
- Soot-Ryen, T. (1955). A report on the family Mytilidae (Pelecypoda). In Allan Hancock Pacific expeditions, Vol. 20(1), The university of Southern California publications, Los Angeles, pp. 1-175.
- Stumpp, M., Hu, M., Casties, I., Saborowski, R., Bleich, M., Melzner, F., Dupont, S. (2013). Digestion in sea urchin larvae impaired under ocean acidification. *Nature Clim Change* 3, 1044-1049.
- Stumpp, M., Trübenbach, K., Brennecke, D., Hu, M. Y., Melzner, F. (2012). Resource allocation and extracellular acid-base status in the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* in response to CO₂ induced seawater acidification. *Aquat Toxicol* 110-111, 194-207.
- Sugano, Y. (2009). DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cell Mol Life Sci* 66, 1387-403.
- Sunda, W. G., Cai, W.-J. (2012). Eutrophication induced CO₂-acidification of subsurface coastal waters: interactive effects of temperature, salinity, and atmospheric P_{CO2}. *Environ Sci Technol* 46, 10651-10659.
- Suzuki, M., Iwashima, A., Kimura, M., Kogure, T., Nagasawa, H. (2013). The molecular evolution of the Pif family proteins in various species of mollusks. *Mar Biotechnol* 15, 145-158.
- Suzuki, M., Saruwatari, K., Kogure, T., Yamamoto, Y., Nishimura, T., Kato, T., Nagasawa, H. (2009). An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation. *Science* 325, 1388-1390.
- Talmage, S. C., Gobler, C. J. (2011). Effects of elevated temperature and carbon dioxide on the growth and survival of larvae and juveniles of three species of northwest Atlantic bivalves. *PLoS ONE* 6(10): e26941. doi:10.1371/journal.pone.0026941
- Tanaka, K., Mizushima, T. (2012). The proteasome: molecular machinery and pathophysiological roles. *Biol Chem* 393, 217-234.
- Termine, J. D., Kleinman, H. K., Whitson, S. W., Conn, K. M., McGarvey, M. L., Martin, G. R. (1981). Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26, 99-105.
- Thomsen, J., Casties, I., Pansch, C., Körtzinger, A., Melzner, F. (2013). Food availability outweighs ocean acidification effects in juvenile *Mytilus edulis*: laboratory and field experiments. *Global Change Biol* 19(4), 1017-1027.

Thomsen, J., Gutowska, M. A., Saphörster, J., Heinemann, A., Trübenbach, K., Fietzke, J., Hiebenthal, C., Eisenhauer, A., Körtzinger, A., Wahl, M., Melzner, F. (2010). Calcifying invertebrates succeed in a naturally CO₂-rich coastal habitat but are threatened by high levels of future acidification. *Biogeosciences* 7, 3879-3891.

Thomsen, J., Melzner, F. (2010). Moderate seawater acidification does not elicit long-term metabolic depression in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 157, 2667-2676.

Tomanek, L. (2012). Environmental proteomics of the mussel *Mytilus*: implications for tolerance to stress and change in limits of biogeographic ranges in response to climate change. *Integr Comp Biol* 52, 648-664.

Tomanek, L. (2011). Changes in the proteome of marine organisms in response to environmental stress, pollutants, infection, symbiosis, and development. *Annu Rev Mar Sci* 3, 14.1-14.27.

Tomanek, L., Zuzow, M. J. (2010). The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance and metabolic costs of thermal stress. *J Exp Biol* 213, 3559-3574.

Tomanek, L., Zuzow, M. J., Hitt, L., Serafini, L., Valenzuela, J. (2012). Proteomics of hyposaline stress in blue mussel congeners (genus *Mytilus*): implications for biogeographic range limits in response to climate change. *J Exp Biol* 215, 3905-3916.

Tomanek, L., Zuzow, M. J., Ivanina, A. V., Beniash, E., Sokolova, I. M. (2011). Proteomic response to elevated P_{CO2} level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. *J Exp Biol* 214, 1836-1844.

Tonoki, A., Kuranaga, E., Tomioka, T., Hamazaki, J., Murata, S., Tanake, K., Miura, M. (2009). Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with the aging process. *Mol Cell Biol* 29(4), 1095-1106.

Tyers, M., Willems, A. R. (1999). One ring to rule a superfamily of E3 ubiquitin ligases. *Science* 284(5414), 601-604.

Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Ill, J. R. Y., Koonin, E. V., Deshaies, R. J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298, 611-615.

Waldbusser, G. G., Voigt, E. P., Bergschneider, H., Green, M. A., Newell, R. I. E. (2011). Biocalcification in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) in relation to long-term trends in Chesapeake Bay pH. *Estuar Coast* 34, 221-231.

Wang, P., Heitman, J. (2005). The cyclophilins. *Genome Biol* 6, 226.

Wang, X., Martindale, J. L., Liu, Y., Holbrook, N. J. (1998). The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signaling pathways on cell survival. *Biochem J* 333, 291-300.

Watson, S.-A., Southgate, P. C., Tyler, P. A., Peck, S. L. (2009). Early larval development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* under near-future predictions of CO₂-driven ocean acidification. *J Shellfish Res* 28(3), 431-437.

Weiss, I. M., Schönlitzer, V., Eichner, N., Sumper, M. (2006). The chitin synthase involved in marine bivalve mollusk shell formation contains a myosin domain. *FEBS Letters* 580, 1846-1852.

Wigley, T. M. L. (1983). The pre-industrial carbon dioxide level. *Clim Change* 5, 315-320.

Wong, K. K. W., Lane, A. C., Leung, P. T. Y., Thiyagarajan, V. (2011). Response of larval barnacle proteome to CO₂-driven seawater acidification. *Comp Biochem Phys D* 6, 310-321.

Zhuang, S., Schnellmann, R. G. (2006). A death-promoting role for extracellular signal-regulated kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 319(3), 991-997.

4 Diskussion

Organismen haben das Potential, auf Änderungen von Umwelteinflüssen biotischer und abiotischer Herkunft zu reagieren. Anpassungsstrategien erfolgen auf genomischer Ebene, die sich auf die differentielle Leistung von Organismen und letztlich auf die Strukturen von Lebensgemeinschaften auswirken können (Abb. 4.1, Hofmann et al. 2005).

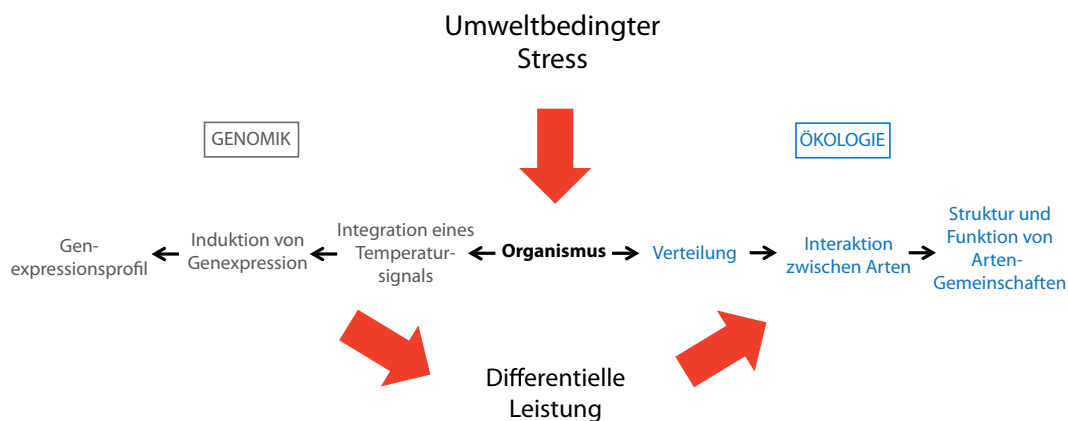


Abb. 4.1: Integration von Genomik, Physiologie und Ökologie während Umweltbelastungen am Beispiel von Temperaturstress (angelehnt an Fig. 1 aus: Hofmann et al., 2005).

Ein in der gegenwärtigen Zeit bedeutsamer Umwelteinfluss, dem marine Organismen ausgesetzt sind, ist eine fortschreitende Ozeanversauerung. Bekannte physiologische Effekte von Kalzifizierern gegenüber diesem Stressor sind beispielsweise Änderungen in der Biomineralisierung oder im Metabolismus. Für die Miesmuschel der Kieler Förde wurde vor Beginn dieser Arbeit ermittelt, dass eine Reduktion in der Kalzifizierung mit zunehmendem $p\text{CO}_2$ sowie eine leichte Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs unter mittleren $p\text{CO}_2$ -Werten (900 und 2000 μatm) erfolgte (Thomsen und Melzner 2010). Dies warf die Frage auf, ob sich entsprechende Änderungen auch auf der transkriptomischen Ebene widerspiegeln. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit einerseits molekulare Mechanismen der Auswirkungen von Ozeanversauerung auf die Miesmuschel *M. edulis* untersucht, und andererseits wurde im Besonderen die Regulation der Kalzifizierung nach mechanischer Beschädigung der Schale näher beleuchtet. Um ein umfassendes Bild möglicher Effekte durch erhöhten $p\text{CO}_2$ zu erhalten, wurden unterschiedliche regulatorische Ebenen des Organismus untersucht. Dazu wurde zunächst ein Transkriptom aus dem Mantelgewebe von *M. edulis* erstellt, welches als Grundlage zur Aufdeckung von gewebespezifischen Transkripten und für die nachfolgenden Genexpressionsstudien genutzt wurde (Publikation I und II). Darüber hinaus erfolgten proteomische Analysen von Mantel- und Kiemengewebe, die mit physiologischen Messungen von Ganztieren komplementiert wurden (Publikation III). Im Folgenden werden die erzielten Ergebnisse zusammenfassend diskutiert und im Hinblick auf zukünftige Perspektiven erörtert.

4.1 Charakterisierung des Mantel-Transkriptoms

Das Transkriptom stellt die Gesamtheit aller transkribierten Gensequenzen des Genoms zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle/eines Gewebes von Organismen dar. Transkriptomische Analysen können als wichtige Hilfsmittel zur Aufdeckung der vorhandenen genomischen Sequenzinformation genutzt werden, weil der größte Anteil des Genoms transkribiert wird (erwähnt in Forrest und Carninci 2009). Schon seit einiger Zeit erfolgen transkriptomische Studien nicht nur zu reinen Sequenzanalysen von z.B. Nicht-Modell-Organismen, sondern vielfach zur Darstellung von differentieller Transkription unter gezielten biologischen Fragestellungen (z.B. Jackson et al. 2002, Thomas und Klaper 2004), auch in der marinen Ökologie (z.B. Hofmann et al. 2005, Lockwood und Somero 2011, Place et al. 2012, De Wit und Palumbi 2013).

In dieser Studie sollten mögliche Änderungen im Transkriptom des Mantelgewebes (pallial/marginal und zentral) nach 8-wöchiger Inkubation von *M. edulis* unter erhöhtem $p\text{CO}_2$ (3700 μatm) aufgedeckt werden und nach Möglichkeit mit physiologischen Prozessen verknüpft werden. Für die Sequenzierungen wurde Mantelgewebe eingesetzt, da dieses Gewebe in der Kalzifizierung der Schale involviert ist, aber auch als metabolisch aktiv gilt.

Das Mantel-Transkriptom ist Teil eines nicht-normalisierten Transkriptoms aus *M. edulis*, welches aus verschiedenen Geweben (Hämozyten, Kieme, Mantel, Fuß, Mitteldarmdrüse, Adduktormuskel) und nach Behandlung mit diversen Stressoren (Temperatur, Verletzung, Lipopolysaccharide, Flagellin, CO_2 , DSS, Sauerstoffmangel) entstanden ist (Philipp et al. 2012). Diese Bandbreite sollte eine nahezu vollständige Sequenzierung des Exoms ermöglichen. Das Gesamt-Transkriptom besteht aus 2.393.441 sequenzierten Reads mit einer durchschnittlichen Länge von 279 Nukleotiden. Von diesen konnten 2.216.965 Reads in 74.622 Contigs, mit einer durchschnittlichen Länge von 645 Nukleotiden, assembliert werden (Philipp et al. 2012). Um eine Contig-Sequenz zu erhalten, wurden die Reads durch Überlappungen von Nukleotiden angelagert, sodass die Contig-Sequenz eine vielfache Länge der einzelnen Reads ausmacht. Die wahrscheinliche Nukleotid-Abfolge (Konsensus-Sequenz) des Contigs wurde dabei statistisch aus der am häufigsten vorkommenden Base pro Position ermittelt. Die Mantel-spezifischen Transkriptom-Charakteristika sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tab. 4.1: Anzahl der sequenzierten und assemblierten Reads und der generierten Contigs aus dem pallialen/marginalen und zentralen Mantel unter Kontrollbedingung (500 μatm , KO) und erhöhtem $p\text{CO}_2$ (3700 μatm , $p\text{CO}_2$).

Gewebe (Bedingung)	sequenzierte Reads	assemblierte Reads	Contigs	
				davon mit BLAST
pallial/marginal (KO)	149.219	135.748	20.592	11.260
pallial/ marginal ($p\text{CO}_2$)	151.291	137.509	20.252	11.094
zentral (KO)	172.838	162.188	18.425	10.961
zentral ($p\text{CO}_2$)	129.360	117.628	18.900	11.192

Die Anzahl der sequenzierten Reads und generierter Contigs pro Gewebe und Inkubationsbedingung ist annähernd ausgewogen. Die Summe der sequenzierten Reads des Mantels (602.708) ist vergleichbar mit der Anzahl sequenzierter Reads aus dem Mantelgewebe von *Laternula elliptica* (778.629, Clark et al. 2010). Im *Mytilus*-Transkriptom konnten 553.073 Reads beider Mantelgewebe assembliert werden. Die Anzahl der in diesem Projekt assemblierten Reads ist größer als die des *Laternula*-Transkriptoms (264.289, Clark et al. 2010), welches durch den Vorteil bedingt sein kann, einzelne Reads bereits bestehenden Contigs aus anderen Geweben von *M. edulis* quantitativ zuzuordnen. Die Prozentsätze der nicht-assemblierten Reads (Singletons) liegen für das Mantel-Transkriptom von *M. edulis* zwischen 6% und 9%. Ein ähnlicher Wert (10%) wurde auch für Singletons eines Mantel-Transkriptoms aus *M. galloprovincialis* erzielt (Craft et al. 2010), welcher nach Ansicht der Autoren auf eine relativ hohe Transkriptom-Abdeckung (Coverage) hindeutet.

Innerhalb dieser Teilstudie waren zentrale Fragen, ob die Zahl der Reads in ihren jeweiligen Contigs durch Hyperkapnie beeinflusst ist, und ob entsprechende Gensequenzen vermehrt oder verringert transkribiert werden. Daher wurden zunächst die Reads, angeglichen in Reads pro 1 Million je Contig im $p\text{CO}_2$ - und Gewebevergleich aufgetragen (Abb. 4.2). Für die Analysen wurden dabei nur solche Contigs ausgewählt, die aus assemblierten Reads beider zu vergleichenden $p\text{CO}_2$ -Stufen oder Gewebe bestanden. In die Analysen konnten somit 11.320 (pallial/marginal KO vs. $p\text{CO}_2$), 10.294 (zentral KO vs. $p\text{CO}_2$), 9798 (pallial/marginal KO vs. zentral KO) und 10.034 Contigs (pallial/marginal $p\text{CO}_2$ vs. zentral $p\text{CO}_2$) einbezogen werden.

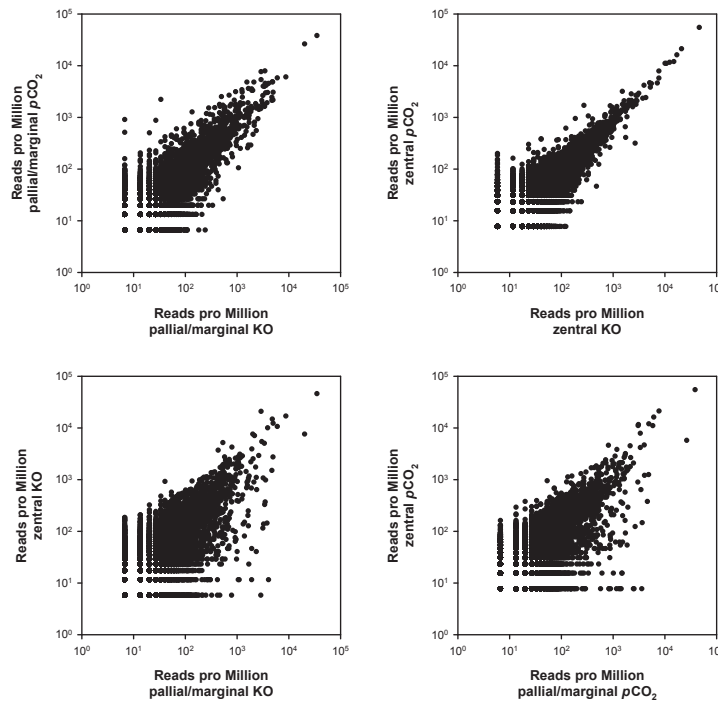


Abb. 4.2: Verteilung der Reads pro Million im Vergleich zwischen 500 μatm (KO) und 3700 μatm ($p\text{CO}_2$) (oben) und zwischen zentralem und pallialem/marginalem Mantelgewebe (unten).

Aus Abb. 4.2 wird erkenntlich, dass die Verteilung der Reads pro Contig bei Vergleichen zwischen den $p\text{CO}_2$ -Stufen relativ homogen erscheint. Gegensätzlich hierzu streuen die Read-Anzahlen pro Contig zwischen den beiden verschiedenen Mantelgeweben. Die Unterschiede in der Read-Anzahl zwischen den Geweben sind somit größer als die Differenzen, die durch eine Inkubation mit erhöhtem $p\text{CO}_2$ hervorgerufen wurden. Zusätzliche Vergleiche von gewebespezifischen Transkripten aus den Kontrollen ergaben, dass 10.794 Transkripte exklusiv im Mantelrand und 8627 Contigs ausschließlich im zentralen Mantel exprimiert waren. Somit waren 251.791 Reads pro Million im Mantelrand und 110.520 Reads pro Million im zentralen Mantel gewebespezifisch vorhanden. Diese Unterschiede in der Expressionsstärke und Gewebespezifität sind durch die unterschiedlichen Funktionen von Geweben begründbar. Da ausgehend vom Mantelrand das Längenwachstum stattfindet (Owen et al. 1953), mögen spezifische Mantelrand-Transkripte mutmaßlich an diesem Prozess beteiligt sein. Das Mantelinnere ist hingegen am Dickenwachstum der Schale beteiligt (Owen et al. 1953) und daher weniger biomineralisierend aktiv.

Da global keine herausragenden Unterschiede in der Read-Zusammensetzung pro Contig nach Inkubation mit erhöhtem $p\text{CO}_2$ festzustellen war, sollte nachfolgend untersucht werden, ob möglicherweise vereinzelte funktionale Gruppen durch erhöhten $p\text{CO}_2$ beeinflusst sind. Um Nukleotidsequenzen eine Funktion zuordnen zu können, kann man sich der Eingruppierung durch "Gene Ontology (GO) Terms" bedienen. Diese können in die drei Kategorien "Biologischer Prozess", "Zelluläre Komponente" und "Molekulare Funktion" aufgeteilt werden. Obwohl Genprodukten mehrere Funktionen pro Kategorie zugeschrieben werden können, wurde für diese Analyse jeweils nur eine Funktion pro Contig ausgewählt, um Mehrfachzählungen von Reads zu verhindern.

Anhand dieser Analysen (Abb. 7.1-3 Anhang) konnten vorwiegend gewebespezifische Unterschiede herausgearbeitet werden. Letztendlich führte dieses Ergebnis zur Charakterisierung entsprechender gewebespezifischer Transkripte (Publikation I). Dagegen offenbarte diese Analyse des Mantel-Transkriptoms von *M. edulis* keine starken globalen Änderungen in den "Gene Ontology"-Zuordnung im Hinblick auf erhöhten $p\text{CO}_2$. Vergleichbar konnten Lockwood und Somero (2011) zeigen, dass sich *M. galloprovincialis* und *M. trossulus* in nur 12 von 6777 Genen art-spezifisch in der Expression nach Salinitätsstress sowie in 96 von 4488 Genen nach Hitzestress im Kiemengewebe unterschieden (Lockwood et al. 2010). Trotz dieser geringen Anzahl an Änderungen in diesem repräsentativen Gewebe (siehe Lockwood und Somero 2011, Lockwood et al. 2010, Gracey et al. 2008) war es der invasiven *M. galloprovincialis*, welche in mediterranen Regionen beheimatet und an wärmere Temperaturen und stabile Salinitäten angepasst ist, möglich, die native *M. trossulus* in bestimmten Zonen vor der kalifornischen Küste zu verdrängen.

Messungen der Kalzifizierung, des Sauerstoffverbrauchs und der Ammoniumexkretion von Tieren der gleichen Inkubation, die Grundlage für das Genexpressions-Experiment war, zeigten, dass die Physiologie der Versuchstiere durch erhöhten $p\text{CO}_2$ modifiziert war (Thomsen und Melzner 2010). Gründe für diese physiologischen Änderungen können Modifikationen in molekularen Mechanismen, wie beispielsweise Umsatzrate von Enzymen, Proteinexpression oder Genexpression sein. Wenn Genexpressionsänderungen hingegen eine entscheidende Rolle bei der Anpassung an Ozeanversauerung spielen, liegt die Vermutung im Hinblick auf die Analysen des Transkriptoms nahe, dass anstatt globaler Änderungen in der Genexpression womöglich auch hier nur einzelne, in der Genexpression modifizierte Transkripte, für eine Anpassung auf physiologischer Ebene sorgen mögen. Daher wurden zusätzlich die Expressionen von Schlüsselenzymen unterschiedlicher physiologischer Prozesse untersucht (Publikation II). Da bei globalen Analysen nur wenige Änderungen im Mantel-Transkriptom unter 3700 μatm ersichtlich waren, lässt sich vermuten, dass dieser hohe $p\text{CO}_2$ außerhalb des kompensatorischen Bereichs der *M. edulis*-Population aus der Kieler Bucht liegt. Daher wurde zusätzlich der Einfluss weiterer $p\text{CO}_2$ -Stufen (900 und 2000 μatm) auf die Genexpression im zentralen und pallialen/marginalen Mantel untersucht, um einen möglichen Dosis-abhängigen Verlauf in der Antwort von Genexpressionsänderungen darstellen zu können. Die Sequenzinformationen des Transkriptoms waren letztlich sowohl für diese Genexpressionsstudie (Publikation II) als auch für die Untersuchung der Regenerationszeit-abhängigen Geninduktion (Publikation I) unerlässlich, da die Quantität der in diesem Projekt sequenzierten Transkripte aus *M. edulis* die der öffentlichen Datenbanken übersteigt.

4.2 Transkriptionelle Regulation der Biomineralisierung

4.2.1 Induktion von Genen nach Schalenverletzung

Das Transkriptom offenbarte vorwiegend gewebespezifische Unterschiede in der Anzahl von Transkripten. Viele der hochexprimierten Transkripte des Mantelrands konnten wegen fehlender Sequenzvergleiche mittels öffentlicher Datenbanken nicht näher in ihrer Funktion charakterisiert werden. Transkripte für Proteine, die möglicherweise an der Biomineralisierung beteiligt sind, können Organismus-spezifische Sequenzen aufweisen. Dies wurde bereits für *Pinctada maxima* und *Haliotis asinina* gezeigt (Jackson et al. 2010). Daher mögen nicht vorhandene Ähnlichkeiten zu Sequenzen anderer Organismen auf biomineralisierende Funktionen hindeuten. Weitere Hinweise auf die Beteiligung von Genen an der Biomineralisierung geben Signalsequenzen der translatierten Peptidsequenzen, die anzeigen, ob ein Protein sezerniert wird und somit extrazellulär Verwendung findet (Jackson et al. 2006).

Zunächst wurde das Transkriptom nach Transkripten durchsucht, die im Mantelrand mindestens 100 Reads pro Million aufwiesen und zudem mindestens 10-fach höher im Mantelrand verglichen zum Gewebemix aus Kieme, Fuß, Adduktormuskel und Mitteldarmdrüse

exprimiert waren. Somit konnten 327 Transkripte gefunden werden, von denen 155 Transkripte Signalsequenzen aufwiesen. Zudem konnten nur 139 der 327 Sequenzen annotiert werden.

Zur Überprüfung einiger dieser potentiell in der Biomineralisierung involvierten Gene wurden Rekalzifizierungsstudien durchgeführt. Hierfür wurden Schalen lebender Muscheln auf einer Seite angebohrt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde das unterliegende Mantelmaterial entnommen und für quantitative *Real-time*-PCR-Studien eingesetzt. Als Zielgene wurden dabei bevorzugt Transkripte ausgewählt, die im pallialen/marginalen Mantel weit höher exprimiert waren als im zentralen Mantelgewebe oder bekannte Funktionen in der Kalzifizierung innehaben. 7 der 10 gewählten Gene (NACR, TYR2, TYR3, TYR6, p4338, CPEROX, CHS) folgten den Charakteristika aus Tab. 5 (>100 Reads pro Million im Mantelrand, >10-fach im Mantelrand verglichen zum Gewebemix exprimiert, Publikation I), NACR, TYR2, TYR3, TYR6 und CPEROX besitzen Signalsequenzen. Vier der getesteten Gene (NACR, TYR3, TYR6, p4338) waren durch das Anbohren der Schale im inneren Mantelgewebe induziert worden. Dabei erfolgte die Induktion dem Synthese-Stadium der Schale entsprechend: die Expression von Tyrosinasen war als Erstes erhöht. Tyrosinasen sind an der Synthese des Periostracums beteiligt (Waite et al. 1983). Das Periostracum wiederum übernimmt initialisierende Funktionen bei der nachfolgenden CaCO₃-Anlagerung (z.B. Petit et al. 1980, Checa 2000). Die Expression von NACR, welches für ein Nacrein-ähnliches Protein kodiert, war an Tag 29 signifikant höher als zu Beginn. Nacrein wird eine regulatorische Funktion bei der Bildung von CaCO₃-Kristallen zugesprochen (Miyamoto et al. 1996, Miyamoto et al. 2005). Transkripte von p4338, einem nicht näher charakterisierten Gen, waren im Mantelinneren der angebohrten Seite über die gesamte Regenerationszeit konstitutiv stärker exprimiert. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Transkripte eine Rolle bei der Schalensynthese spielen und den jeweiligen Bedürfnissen entsprechend induziert werden können. Die vorliegende Studie (Publikation I) erlaubt zusätzlich eine Verknüpfung der erhobenen Genexpressionsdaten mit dem zeitlichen Ablauf der Neusynthese von Schalenbestandteilen, die mittels stereomikroskopischen, rasterelektronenmikroskopischen und Raman-spektroskopischen Analysen erfasst wurden. Durch diese Kombination konnten induzierte oder verstärkt exprimierte Gene einem bestimmten Polymorph zugeordnet werden. Eine vermehrte Expression einer Tyrosinase und weiterer zahlreicher Gene, die eine mögliche Rolle bei der Kalzifizierung spielen, wurde auch nach Schalenbeschädigung bei *Crassostrea gigas* beobachtet (Wang et al. 2013). Offenbar stellen Rekalzifizierungsexperimente eine geeignete Methode dar, mit der Genfunktionen im Hinblick auf Biomineralisierung charakterisiert werden können.

4.2.2 Einfluss von erhöhtem $p\text{CO}_2$

Auswirkungen von erhöhtem $p\text{CO}_2$ auf die Kalzifizierung sind divers und reichen von vermehrter Kalzifizierung bis hin zu reduzierter Biomineralisierung (Ries et al. 2009, Kroeker et al. 2010). Muscheln aus der 8-wöchigen-Inkubation waren durch einen linearen Abfall in

Schalenlänge und -masse mit steigendem $p\text{CO}_2$ gekennzeichnet (Thomsen und Melzner 2010). Da der Prozess der Kalzifizierung die Bereitstellung der organischen Matrix und der Calciumkarbonatkomponenten beinhaltet, kann die Frage gestellt werden, welche dieser beiden Gruppen limitierend auf die Biomineralisierung in *M. edulis* wirken kann. Daher wurden diverse Transkripte, die im Haushalt von Ca^{2+} und HCO_3^- beteiligt sind und die der organischen Matrix zugehörig sind, für Genexpressionstudien ausgewählt. Unerwarteter Weise war die Mehrheit dieser getesteten Gene nicht durch erhöhten $p\text{CO}_2$ in ihrer Expression verändert. Dies steht im Gegensatz zu Microarray-Studien von larvalen Seeigeln, in denen eine Reduktion in der Expression von zahlreichen biomineralisierenden Genen gemessen worden war (Todgham und Hofmann 2009, O'Donnell et al. 2010). Allerdings waren die Larven in diesen Experimenten nur kurzzeitig einem erhöhten $p\text{CO}_2$ ausgesetzt und nicht, wie in dieser Arbeit, über mehrere Wochen inkubiert worden. Möglicherweise kann zunächst eine modifizierte Genexpression als Kurzzeit-Reaktion auf Änderungen von Umwelteinflüssen erfolgen, die sich jedoch über einen längeren Zeitraum hin wieder dem Kontrollniveau annähern kann. Ähnliches wurde für diverse Gene gezeigt, die in der Ionenregulation von *Zoarcetes viviparus* involviert sind (Deigweiher et al. 2008). In anderen Studien wurden nur vereinzelte Expressionen von biomineralisierenden Genen aus Mollusken nach Kurzzeit-Inkubation unter erhöhtem $p\text{CO}_2$ bestimmt: nach 21 Tagen war die Expression einer Chitinsynthase im Mantel von *Laternula elliptica* erhöht (735 μatm , Cummings et al. 2011), und nach 96 h war die Expression von Nacrein bei 1400 μatm in adulten Austern (*Pinctada fucata*) signifikant geringer als unter Normbedingung (Liu et al. 2012). Verglichen dazu erfolgte in diesen beiden Genen aus *M. edulis* keine signifikante Änderung in der Expression (Publikation II). Die Expression einer Chitinase war jedoch im Mantelrand von *M. edulis* unter 3700 μatm signifikant geringer. Die Expression folgte dem Muster der Reduktion von Schalenmasse und -länge der Versuchstiere. In beiden Mantelgeweben konnte eine starke Erhöhung der Expression einer Tyrosinase (TYR1) nachgewiesen werden, die möglicherweise an der Synthese des Periostracums beteiligt ist. Da das Periostracum die Schale von außen umgibt und diese vor äußeren abiotischen und biotischen Angriffen schützt, spielt eine aktive molekulare Regulation von Tyrosinasen daher möglicherweise eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung oder bei einer verstärkten Synthese des Periostracums.

4.2.3 Tyrosinasen

In dieser Arbeit wurden die Expressionslevel und die Read-Anzahlen verschiedener Tyrosinasen (TYR1-7) während der Rekalzifizierungsstudien (Publikation I) oder nach Inkubation von 8 Wochen unter erhöhtem $p\text{CO}_2$ (Transkriptom, Publikation II) beleuchtet. Hierbei konnte herausgestellt werden, dass die Expression von Tyrosinasen variabel und hochmodulativ auf beide Stressoren reagiert (Abb. 4.3). Die Verteilung der induzierbaren

Tyrosinasen über mehrere phylogenetische Zweige mag die große Bedeutung für *M. edulis* widerspiegeln, diese Transkripte aktiv in ihrer Genexpression zu regulieren.

Mit zunehmendem $p\text{CO}_2$ war die Expression von TYR1 im zentralen und im pallialen/marginalen Mantel erhöht. Einen Anstieg der Read-Anzahl bei 3700 μatm war auch für TYR3 und TYR4 auszumachen. Die Expressionen dieser Tyrosinasen verhalten sich invers zu einer Abnahme der Schalenmasse und -länge von *M. edulis* mit steigendem $p\text{CO}_2$ (Thomsen und Melzner 2010). Dagegen erfolgte nach Anbohrungen der Muschelschalen zu Beginn der Regeneration eine Induktion der Tyrosinase-Expression von TYR3 und TYR6, die zeitnah zum Anschalten der Aragonit- und Kalzit-Synthese erfolgte (Publikation I). Einen Anstieg in der Expression einer Tyrosinase wurde ebenfalls im Zeitraum ab Tag 1 bis Tag 21 nach Schalenbeschädigung im Mantel von *Crassostrea gigas* entdeckt (Wang et al. 2013). Beide Ergebnisse unterstützen somit die These einer initialisierenden Funktion des Periostracums bei der Anlagerung von CaCO_3 -Kristallen (Petit et al. 1980, Checa 2000).

In der Regenerationsstudie konnte dargestellt werden, dass bestimmte Tyrosinase-Transkripte zu Beginn der Rekalzifizierung im zentralen Mantel induziert waren und mit der Zeit abnahmen (z.B. TYR3+6). Huan et al. (2013) entdeckten, dass die Genexpression einer bestimmten Tyrosinase nach dem D-Veliger-Stadium von *C. gigas* nicht mehr messbar war. Die Autoren postulieren, dass diese Tyrosinase nur während der initialen Phase der larvalen Schalensynthese funktionell ist. Somit ließe sich die Vielzahl der im Transkriptom von *M. edulis* nachgewiesenen und zum Teil phylogenetisch diversen Tyrosinasen durch deren spezifische Induktion während verschiedener Schalensynthese-Stadien und Anstieg durch erhöhten $p\text{CO}_2$ erklären.

In der Literatur werden, abhängig von der Lokalisierung der Transkripte, vielfältige Funktionen von Tyrosinasen diskutiert: Nagai et al. (2007) konnten Tyrosinase-mRNA spezifisch im Mantel der Auster *Pinctada fucata* detektieren. Da entsprechende Tyrosinase-Proteine in der prismatischen Schicht zu finden waren, mutmaßten die Autoren, dass die Tyrosinasen in diesem Organismus bei der Melanogenese der Schale eine Rolle spielen. Hingegen wiesen Zhang et al. (2006) Transkripte einer Tyrosinase ausschließlich in den äußeren Epithelzellen der mittleren Mantelfalte von *P. fucata* nach und postulierten eine entsprechende Funktion in der Periostracum-Synthese. Desweiteren waren Transkripte einer Tyrosinase in *P. maxima* exklusiv in der äußeren Mantelfalte exprimiert (Gardner et al. 2011). Ebenfalls zählte das Gen einer Tyrosinase zu den am stärksten exprimierten Transkripten im Mantel von *Laternula elliptica* (Clark et al. 2010), welches auf eine in dieser Publikation nicht näher beschriebene Funktion bei der Schalenbildung hindeutet. Zhou et al. (2012) konnten nachweisen, dass die Genexpression einer ubiquitären Tyrosinase in den Hämocyten von *Chlamys farreri* nach Lipopolysaccharid-Stimulierung anstieg. Dieser Tyrosinase wurde eine mögliche Funktion in der Immunantwort zugeschrieben. Da Tyrosinasen offensichtlich in

mehreren Prozessen eine Rolle spielen können, stellt sich für diese Arbeit die Frage, ob die während der Regeneration bestimmten Anstiege in der Tyrosinase-Genexpression nicht mit einer erhöhten Immunantwort als Folge der Schalenbeschädigung in Zusammenhang gebracht werden müssten. Anhand der Analyse der Transkriptomdaten kann eine Expression der betrachteten Tyrosinasen in den Hämocyten und dadurch deren vordergründige antibakterielle Funktion jedoch ausgeschlossen werden.

Die Erhöhung der Tyrosinase-Expression bei einer reduzierten Kalzifizierung unter Ozeanversauerung oder ihre Induktion bei Schalenneusynthese verdeutlichen, dass Tyrosinasen sensitiv reagieren und wichtige Schlüsselfunktionen in der phänotypischen Plastizität unter Ozeanversauerungsszenarien aber auch bei der Schalenregeneration innehaben.

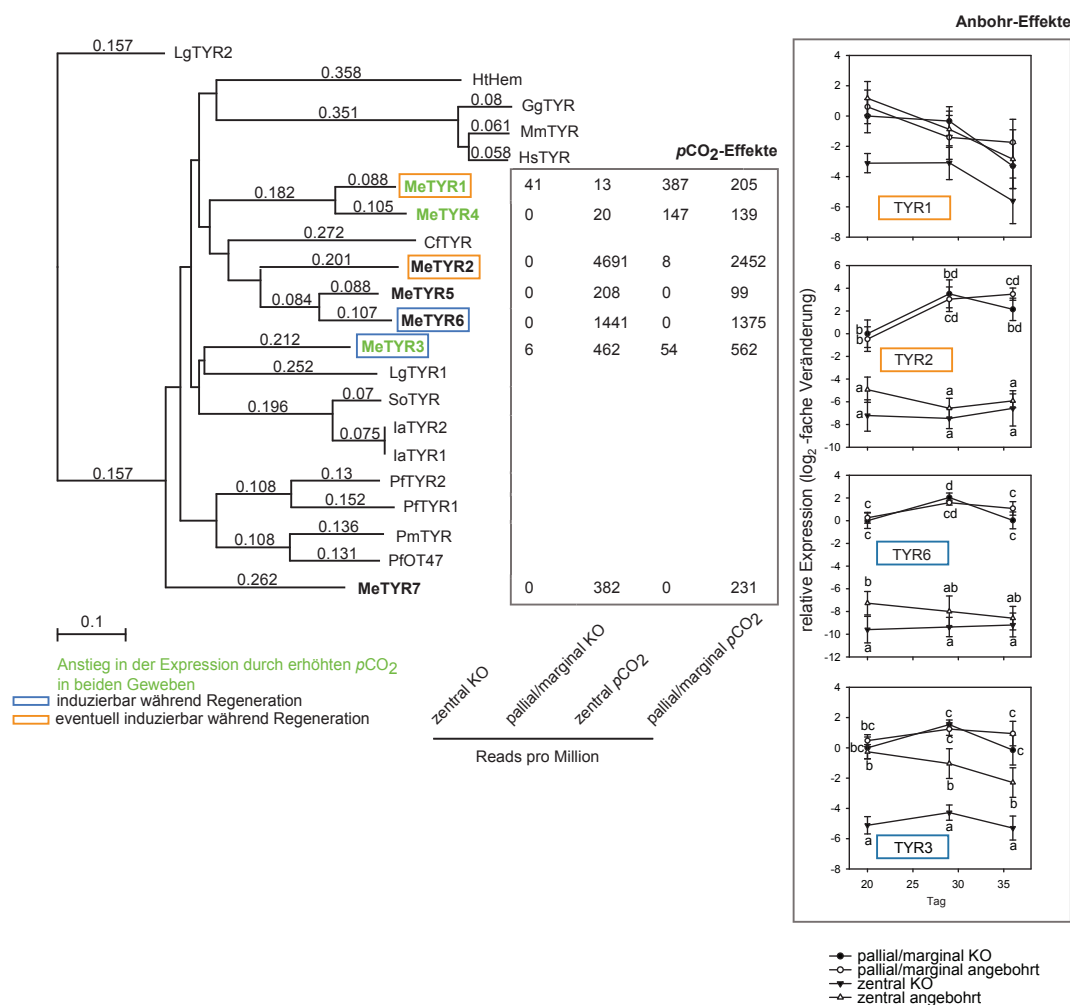


Abb. 4.3: Zusammenstellung der Charakteristika von näher untersuchten Tyrosinasen aus *M. edulis*. Phylogenetischer Baum von Proteinsequenzen unter Einbeziehung der Kupferbindungsstelle CuA (zuständig für die Phenoloxidase-Aktivität) verschiedener Tyrosinasen und eines Hämocyzytins (links, detaillierte Beschreibung siehe Publikation II, Abb. 2 und 3 Anhang) und Kennzeichnung der näher untersuchten Tyrosinasen aus *M. edulis* entsprechend den Genexpressionscharakteristika "Anstieg in der Expression durch erhöhtes pCO₂ in beiden Geweben", "induzierbar während Regeneration" und "eventuell induzierbar während Regeneration". Diese Einteilungen wurden anhand der Anzahl der Reads pro Million im pCO₂-Vergleich (Mitte) und der Genexpressionsdaten aus der Regenerationsstudie (rechts, Publikation I) vorgenommen.

4.3 Auswirkungen von erhöhtem $p\text{CO}_2$ auf die Transkription metabolischer und immunaktiver Gene des Mantels

Zur Überprüfung des Einflusses von Ozeanversauerung auf metabolische Prozesse im zentralen und pallialen/marginalen Mantel wurde die Expression verschiedener Gene gemessen, die für Proteine aus dem anaeroben/aeroben ATP-Umsatz, dem Zitratzyklus, dem Aminosäuremetabolismus und der Stressantwort kodieren. Die meisten Gene zeigten keine signifikante Änderung in der Expression (Publikation II, Abb. 2). Die auffälligste Veränderung war eine signifikante Reduktion der Expression von zwei ATP-Synthase-Untereinheiten der Komplexe F_1 und F_0 unter moderatem $p\text{CO}_2$ (900 und 2000 μatm) im Mantelrand. Eine verringerte Expression von ATP-Synthase-Untereinheiten unter moderaten $p\text{CO}_2$ -Szenarien wurde auch bei anderen Kalzifizierern, wie beispielsweise Seeigellarven (Todgham und Hofmann 2009, O'Donnell et al. 2010) und Korallen (Moya et al. 2012) festgestellt. In den meisten Fällen wird ein Sinken in der ATP-Synthase-Expressionsrate im Sinne einer metabolischen Depression diskutiert. Dieses trifft jedoch nicht auf die Muscheln dieses Experiments zu, da der Sauerstoffverbrauch des Ganztiers unter mittlerem $p\text{CO}_2$ anstieg (Thomsen und Melzner 2010).

Mittels Korrelationsnetzwerken konnte eine enge Vernetzung der Expression der ATP-Synthase-Einheiten (aerobe ATP-Gewinnung) und der Transkriptmenge der Pyruvatkinase (anaerobe ATP-Produktion) und somit von Atmungskette und Glykolyse in beiden Mantelgeweben (Publikation II, Abb. 3) nachgewiesen werden. Diese potentielle Transkriptionseinheit war auch unabhängig vom Einfluss durch $p\text{CO}_2$ vorhanden (Publikation II, Abb. 1 Anhang). Einen gekoppelten Anstieg in der Expression von Pyruvatkinase und der ATP-Synthase β -Untereinheit war unter erhöhtem $p\text{CO}_2$ in Larven des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* bestimmt worden (Stumpp et al. 2011b). Hierbei erfolgte eine vermehrte Expression dieser metabolischen Gene jedoch zusammen mit einem Anstieg in der Respirationsrate (Stumpp et al. 2011a). Bei *M. edulis* war die Transkriptmenge der Hexokinase, dem initialisierenden Enzym der Glykolyse, nicht mit den Expressionsänderungen der Pyruvatkinase korreliert. Dies kann dadurch erklärbar sein, dass Zwischenprodukte der Glykolyse in andere Stoffwechselwege, wie beispielsweise dem Pentosephosphatweg, eingeschleust werden. Somit ist eine unterschiedliche Regulation innerhalb der Enzyme der Glykolyse wahrscheinlich. Da die ATP-Synthase-Untereinheiten innerhalb der Korrelationsnetzwerke mit der Pyruvatkinase, jedoch nicht mit der Hexokinase vernetzt ist, scheinen molekulare Mechanismen, die zum Wechsel zwischen aeroben und anaeroben Metabolismus bei *M. edulis* unter erhöhtem $p\text{CO}_2$ führen, komplex zu sein.

Als weitere $p\text{CO}_2$ -Effekte können Beeinträchtigungen in der Gesundheit (Beesley et al. 2008) und in der Immunantwort (Bibby et al. 2008) von *M. edulis* vermutet werden. Daher wurde zusätzlich die Expression von Mytilinen, antimikrobiellen Peptiden aus Hämocyten und

Plasma mit immunaktiven Funktionen (Mitta et al. 2000, Charlet et al. 1996), untersucht. Da Miesmuscheln ein offenes Blutsystem haben, sollten auch Hämozyten-spezifische Transkripte im Mantelgewebe nachweisbar sein. Die Genexpression der zwei ausgewählten Mytiline hatte sich jedoch nicht durch einen erhöhten $p\text{CO}_2$ verändert. Die hohe Anzahl an Reads von Mytilinen in den Hämozyten von *M. edulis* spricht daher möglicherweise für eine konstitutive Expression von Mytilinen. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass in der Hämolymphe von *M. edulis* nach Zugabe von Bakterien kein Anstieg der antimikrobiellen Peptide erfolgte (Charlet et al. 1996) und die Expression von Mytilinen in Hämozyten von *M. galloprovincialis* 48h nach Bakterieninjektion vergleichbar zur Kontrolle war (Mitta et al. 2000).

4.4 Auswirkungen von erhöhtem $p\text{CO}_2$ auf das Proteom von Mantelrand und Kieme

In der vorhergegangenen Studie (Publikation II) wurden die Auswirkungen von erhöhtem $p\text{CO}_2$ auf die Transkription von *M. edulis* beleuchtet. Da jedoch sowohl transkriptionelle Änderungen wie auch Proteinmodifikationen die Physiologie von Organismen verändern können, wurde in der 3. Studie (Publikation III) die differentielle Proteinexpression im Hinblick auf erhöhten $p\text{CO}_2$ untersucht. Hierfür wurde ein zu Inkubation II (8 Wochen) vergleichbares Experiment (1 Jahr) durchgeführt. Physiologische Messungen der Tiere zeigten, dass diese nach ein-jähriger Inkubation bei 4200 μatm durch eine reduzierte Schalenlänge und -masse, sowie eine abfallende Filtration mit steigendem $p\text{CO}_2$ gekennzeichnet waren. Somit stellt sich die Frage, welche Änderungen im Proteom die Grundlage für diese Ganztierbefunde sind. Dazu wurden für proteomische Studien die Gewebe ausgewählt, die vorrangig für Biomineralisierung (Mantelrand) und Filtration (Kieme) zuständig sind.

So konnte gezeigt werden, dass jeweils 8% der Proteine aus Mantelrand und Kieme durch einen erhöhten $p\text{CO}_2$ in ihrer Expression oder durch post-translationale Modifikationen verändert waren (Publikation III). Dieser Wert ist vergleichbar mit der Anzahl der geänderten Proteine aus dem Mantelrand der Auster (*Crassostrea virginica*) nach zwei-wöchiger Inkubation bei 3500 μatm (12%, Tomanek et al. 2011). 42% der geänderten Proteine aus dem Mantelrand konnten identifiziert werden. Dieser etwas höhere Prozentsatz, verglichen zu dem aus dem Auster-Experiment (31%, Tomanek et al. 2011), kann durch die Veröffentlichung des Auster-Genoms von *Crassostrea gigas* (Zhang et al. 2012) vor diesem Projekt begründet sein. Vielfach wurden für *M. edulis* Sequenzen anhand des Auster-Genoms identifiziert (Mantel: 38%; Kieme: 50%). Die meisten der geänderten Proteine im Mantelrand von *M. edulis* gehören Zytoskelettkomponenten an oder sind Bestandteile der extrazellulären Matrix. In gleicher Weise führte die Kurzzeit-Inkubation der Auster *C. virginica* unter erhöhtem $p\text{CO}_2$ zu Modifikationen von Zytoskelettkomponenten im Mantel (Tomanek et al. 2011). Der Anteil der identifizierten Proteine aus der Kieme war mit dem Mantelrand vergleichbar (42%). Allerdings verteilten sich

diese Proteine auf zahlreiche zelluläre Funktionen, wie Zytoskelett, extrazelluläre Matrix, oxidativer Stress, Proteinabbau, Energiemetabolismus, Proteinmodifikation und Zellzyklus. Graphische Darstellungen mittels Heatmaps und Expressionsprofilen einzelner Proteine (Publikation III, Anhang) verdeutlichten, dass die mittleren $p\text{CO}_2$ -Konzentrationen am häufigsten Einfluss auf die Abundanzen der Proteine beider Gewebe hatten.

Obwohl die Inkubationen II und III eine unterschiedliche Dauer vorwiesen, waren die Versuchstiere hinsichtlich ihrer Kalzifizierungsraten, wichtiger Parameter für den Langzeit-Leistungsparameter Wachstum, durch erhöhten $p\text{CO}_2$ negativ beeinflusst (Thomsen und Melzner 2010, Publikation III). Daher bietet es sich im Folgenden (Abschnitt 4.5) an, die transkriptomische mit der proteomischen Studie zu vergleichen und in Bezug zur Physiologie der Tiere zu setzen.

4.5 Kohärenz von Genexpression, Proteom und systemischer Kapazität unter erhöhtem $p\text{CO}_2$

Zur Aufrechterhaltung von biologischen Funktionen müssen Zellen intrinsische und umweltbedingte Informationen integrieren und regulatorische Mechanismen der Genexpression koordinieren (Mata et al. 2005). Regulationen auf transkriptioneller Ebene erfolgen durch ein Anpassen der Transkriptionsrate, post-transkriptionelle Kontrollen bestimmen hingegen die Zerfall- und Translationsrate von Transkripten (Mata et al. 2005). Im weiteren Verlauf entscheiden post-translationale Modifikationen, wie beispielsweise Glykosylierungen, über Stabilität und Faltung von Proteinen (Nalivaeva und Turner 2001). Desweiteren können Modifikationen von Proteinen mit Lipiden bei Signaltransduktionen eine Rolle spielen (Nalivaeva und Turner 2001). Zusätzlich können sich Aktivitäten von Proteinen durch Umwelteinflüsse verändern (z.B. Temperaturanstieg: Windisch et al. 2011). Können trotz dieser vielfältigen regulatorischen Stufen Rückschlüsse von RNA auf Proteinexpression (-modifikation) und Leistung von Organismen gezogen werden? Da in dieser Arbeit sowohl die Auswirkungen von erhöhtem $p\text{CO}_2$ auf molekulare regulatorische Einheiten, wie der Transkription (Transkriptom, Genexpression) und der Proteinexpression und -modifikation (Proteom) als auch auf die Physiologie der Tiere untersucht wurden, werden in diesem Kapitel mögliche Vernetzungen der unterschiedlichen Regulationsstufen beleuchtet, aber auch Limitierungen dieser Herangehensweise für *M. edulis* in Bezug auf die durchgeführten Versuche dargestellt.

Verglichen zu transkriptomischen Analysen ist die Anzahl der aufgetrennten Proteine im 2D-Gel gering: Bestand das Transkriptom des Mantelrands aus ca. 20.000 Contigs pro Inkubationsbedingung, so konnten im Summen-Proteom-Gel lediglich 373 Proteinspots detektiert werden. Diese Unterschiede können durch verschiedene Gründe bedingt sein. Zum einen lassen sich, abhängig von der Wahl des Protokolls zur Erstellung des Proteinextrakts,

entweder bevorzugt zytosolische oder membranständige Proteine aus den Proben isolieren. Proteine werden zudem in ihrer 1. Dimension entsprechend ihrem pH aufgetrennt. Abhängig von der Wahl des pH-Bereichs können Proteine, deren isoelektrische Punkte außerhalb dieses Bereichs liegen, nicht elektrophoretisch aufgetrennt werden. Innerhalb der proteomischen Studie wurde ein pH-Bereich von 4-7 gewählt. Beispielsweise konnten daher stark saure und lösliche Matrixproteine aus dem Mantelrand, sowie weitere basische Proteine nicht analysiert werden. Desweiteren liegt die Nachweisgrenze für Proteinspots bei Färbung mit Coomassie, wie es in dieser Studie benutzt wurde, bei etwa 100 ng (erwähnt in Shevchenko et al. 1996), sodass gering-exprimierte Proteine, wie beispielsweise viele Regulationsproteine, unter diese Nachweisgrenze fallen. Im Gegensatz dazu können durch Sequenzierung der vorliegenden mRNA Transkripte mit geringen Kopienzahlen identifiziert werden (Kettman et al. 2001, diese Arbeit). Für *M. galloprovincialis* und *M. trossulus* existieren eine Microarraystudie und eine proteomische Analyse, welche den Einfluss von Hitzestress (24, 28 und 32°C) auf Kiemengewebe untersuchen (Lockwood et al. 2010, Tomanek und Zuzow 2010). Auch hier wurde deutlich, dass eine Hybridisierung an zahlreicheren Sonden erfolgte als Proteine im Gel aufgetrennt wurden. Zudem war der prozentuale Anteil an geänderten Genen höher als der der Proteine. Trotz dieser hohen quantitativen Unterschiede gab es jedoch beträchtliche qualitative Überschneidungen, da vielfach Regulationen in Proteinen bzw. Genen derselben Stoffwechselwege sichtbar wurden.

Ein Vergleich zwischen Änderungen in der Genexpression und den Proteinabundanz ist nur dann möglich, wenn die Proteine anhand von Datenbanken identifiziert werden können. In dieser Arbeit wurde zur Identifikation der Proteine mittels detektierter Peptide zunächst nach Ähnlichkeiten mit Sequenzen aus dem *Mytilus*-Transkriptom gesucht. Daher konnten für 11 von 13 geänderten Proteinen des Mantelrands entsprechende Contigs zugeordnet werden. Hierbei wurden diejenigen Contigs in Betracht gezogen, deren translatierte Sequenz die meisten identifizierten Peptide enthielten. Vergleiche der Änderungen in der Read-Anzahl und der Protein-Spot-Intensitäten des Mantelrandgewebes zeigten, dass eine gleichgerichtete Regulation für ca. 55% der Proteine und deren Transkripte gegeben war (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Vergleiche von Read-Anzahl und entsprechenden Intensitäten der Protein-Spots aus dem pallialen/marginalen Mantel unter erhöhtem $p\text{CO}_2$ (Transkriptom: 500 μatm (Kontrolle), 3700 μatm ($p\text{CO}_2$); Proteom: 600 μatm (Kontrolle), 4200 μatm ($p\text{CO}_2$)). Identifikationen erfolgten aus der transkriptomischen und der proteomischen Studie. Fettgedruckte Werte indizieren gleichgerichtete Änderungen und rot markierte Werte entgegengerichtete Änderungen, * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und $p\text{CO}_2$.

Contig	Identifikation (transkriptomische Studie)	Transkriptom $p\text{CO}_2$ (in % zur Kontrolle)	Proteom $p\text{CO}_2$ (in % zur Kontrolle)	Identifikation (proteomische Studie)	Spot-ID
37408	Kollagen α -6(VI)- Kette	80	105	Kollagen α -5(VI)- Kette	3
18615	Kollagen α -1(XII)- Kette	91	83	Kollagen α -6(VI)- Kette	4
51792	Tektin-4	88	120	Tektin-4	5
6495	Matrilin-1	205	27	unbekannt (vWFA Domäne)	14
68775	unbekannt	25	92	unbekannt	21
8161	β -Tubulin	65	90	β -Tubulin	25
Kein Hit	-	-	99	β -Tubulin	26
3226	β -Tubulin	71	89	β -Tubulin	28
Kein Hit	-	-	108	Aldehyd-Reduktase	31
2544	Neurofilament- Protein	93	78	Intermediärfilament- Protein	36
36407	Peptidylprolyl- Isomerase B	223	91	Peptidylprolyl- Isomerase B	43
4647	Aktin	118	126	Aktin	44
3871	Aktin	84	129*	β -Aktin	45

Die teilweise nicht konsistente Regulation auf transkriptomischer und proteomischer Ebene der hier dargestellten Transkripte und Proteine kann verschiedene Gründe haben. Da die Miesmuscheln der Kieler Förde jahreszeitlich bedingt $p\text{CO}_2$ -Werte von bis zu 2300 μatm ausgesetzt sind (Thomsen et al. 2010), wurde vor Beginn dieser Studie davon ausgegangen, dass unter höchstem $p\text{CO}_2$ (3700 μatm) die stärksten Änderungen in physiologischen und transkriptionellen Antworten erfolgen würden. Daher wurde das Transkriptom aus Mantelgewebe von Tieren erstellt, die unter Kontroll- $p\text{CO}_2$ (500 μatm) und stark erhöhtem $p\text{CO}_2$ (3700 μatm) inkubiert wurden. Erst durch diese Arbeit wurde deutlich, dass der molekulare Kompensationsbereich in Bezug auf Änderung von Genexpression und Proteinabundanzen der Miesmuscheln unterhalb von 3700 μatm liegt. Durch diesen Versuchsansatz können daher nur Vergleiche zwischen Genexpressionsänderungen und Proteinabundanzen bei hohem $p\text{CO}_2$ (3700 und 4200 μatm) erfolgen. Die erhobenen Daten unter diesen $p\text{CO}_2$ lieferten jedoch nur geringe Änderungen von den Kontrollwerten. Beispielsweise zeigte nur Proteinspot 45 aus Tab. 4.2 einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollbedingung und 4200 μatm . Somit können geringfügige Abweichungen vom Kontrollwert umso mehr zu entgegengesetzten Trends zwischen beiden Methoden führen. Anhand Tab. 4.2 ist zudem ersichtlich, dass sich eindeutige Regulationen von Transkripten, wie

beispielsweise die der Contigs 6495, 68775 und 36407, nicht in den Proteomdaten widerspiegeln. In den Contig 68775 wurden nur sehr wenige Reads (27 pro Million KO und 7 pro Million $p\text{CO}_2$) zugeordnet, sodass eine aussagekräftige Quantifizierung der Änderungen dieses Contigs schwierig bleibt. Möglicherweise sind die Transkripte und Proteine von Matrilin-1 (87 Reads pro Million KO, 178 Reads pro Million $p\text{CO}_2$) und einer Peptidylprolyl-Isomerase B (281 Reads pro Million KO, 628 Reads pro Million $p\text{CO}_2$) unterschiedlich transkriptional und post-translational reguliert.

Es bleibt die Frage bestehen, ob und wie stark mRNA-Expressionen mit Protein-Abundanzen korreliert sind, zudem der Transkription mehrere Regulationsstufen, wie post-transkriptionale, post-translationale Modifikationen, sowie Änderungen in Enzymaktivitäten folgen können. Für die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte beispielsweise dargestellt werden, dass entsprechende Korrelationen sowohl schlecht als auch gut sein können (Gygi et al. 1999, Futcher et al. 1999, Hack 2004). Die Korrelation scheint abhängig von der Transkriptmenge und der Proteinexpression sowie deren Regulationen zu sein. Stark exprimierte Proteine aus Leber und Niere der Maus korrelierten beispielsweise gut mit den dazugehörigen transkribierten Sequenzen (Mijalski et al. 2004). Wenn fehlende Korrelationen zwischen RNA und den entsprechenden Proteinen bestimmt wurden, war jedoch zumeist eine Änderung von Proteinen und Transkripten der gleichen Gruppen oder Stoffwechselwege in differentiellen Analysen ersichtlich (Mukosazellen vom menschlichen Darm: Habermann et al. 2007, Ovarzellen des chinesischen Hamsters: Nissom et al. 2006, Kiemengewebe von *M. trossulus* und *M. galloprovincialis*: Lockwood et al. 2010, Tomanek und Zuzow 2010). Da transkriptionelle Regulationen meistens in der frühen Phase der Anpassungen stattfinden (z.B. Deigweiher et al. 2008), aber in dieser Arbeit Langzeiteffekte untersucht wurden, können Unstimmigkeiten in der Korrelation in *M. edulis* durchaus abhängig von der Versuchsdauer sein. Somit könnte postuliert werden, dass Änderungen in der Genexpression in einer frühen Anpassungsphase erfolgen, Modifikationen von Proteinen auch im späteren Verlauf noch sichtbar sind.

Stellt man die geänderten Transkripte der Genexpressionsstudie (Publikation II) den modifizierten Proteinen der Proteomstudie (Publikation III) gegenüber, so wird offenbar, dass sich keine direkte Übereinstimmung von Transkripten und Proteinen finden lassen. Wurden für die Genexpressionsstudie Kandidatengene gezielt ausgesucht, so hätte man im Proteom Proteine stark regulierter Transkripte, wie beispielsweise die der Tyrosinase TYR1, erwartet. Da Tyrosinasen jedoch membranständige Glykoproteine sind (Olivares und Solano 2009), konnten diese durch die Wahl des Protokolls zur Extraktion von zytosolischen Proteinen nicht aufgetrennt werden. Durch die Genexpressionsstudie wurde deutlich, dass die Transkriptmengen von F_1 - und F_0 -Untereinheiten der ATP-Synthase durch moderat erhöhten $p\text{CO}_2$ verringert waren. Der F_1 -Komplex ist wasserlöslich und hätte mit dem gewählten

Protokoll zur Proteinisolierung aufgetrennt werden müssen. Die Proteine der Untereinheiten der ATP-Synthase sind allerdings hoch exprimiert (z.B. Fountoulakis und Suker 2002), wodurch ein Nachweis von signifikanten Änderungen im Proteingel erschwert wird. Da die meisten anderen durch CO₂ beeinflussten Gene zumeist eher geringe Änderungen in der Expression zeigten, mögen diese keine massiven Änderungen in der Proteinexpression und -modifikation hervorrufen.

Eine Gemeinsamkeit beider Studien ist eine häufige Modulation der Transkript- und Proteinmengen bei mittlerem $p\text{CO}_2$. Diese äußern sich jedoch nicht grundsätzlich in signifikanten Änderungen, da mittels ANOVA aus parabel-förmigen Verläufen schwerlich Signifikanzen berechnet werden können. Offensichtlich scheinen besonders moderate $p\text{CO}_2$ (900-2400 μatm) transkriptionelle und translationale, bzw. post-translationale Reaktionen hervorzurufen. Umgekehrt deutet die homogene Read-Verteilung im Mantelgewebe der Kontrollen und der Tiere unter hohem $p\text{CO}_2$ (500 vs. 3700 μatm) darauf hin, dass sich auch bei globaler Analyse von ca. 10.000-11.000 Contigs nur geringe Expressionsunterschiede zeigen. Somit kann postuliert werden, dass die Miesmuschel der Kieler Förde unter moderatem $p\text{CO}_2$ transkriptional und translational bzw. post-translational reguliert und kompensiert, jedoch unter hohem $p\text{CO}_2$ eine Drosselung dieses Vermögens stattfindet.

In Publikation II waren verringerte Genexpressionsraten von ATP-Synthase-Untereinheiten unter mittlerem $p\text{CO}_2$ im Mantelrand bestimmt worden. Da die ATP-Synthase ein Bestandteil der Atmungskettenkomponenten in den Mitochondrien ist, sollten Änderungen in der Genexpression von ATP-Synthase-Untereinheiten einen Hinweis auf Modifikationen im aeroben Stoffwechsel liefern. Der Mantel macht jedoch nur einen Teil des Tieres aus, sodass es plausibel erscheint, dass die Miesmuscheln aus diesem Experiment physiologisch hingegen einen Anstieg in der Sauerstoffverbrauchsrate unter moderatem $p\text{CO}_2$ zeigten (Thomsen und Melzner 2010). Da hingegen auf Proteinexpressionsebene keine Modifikationen in den Untereinheiten des F₁-Komplexes der ATP-Synthase sichtbar waren, ist für dieses Enzym eine Verknüpfung zwischen Gen- und Proteinexpression mit den physiologischen Änderungen im Sauerstoffverbrauch kritisch. Eine Reduktion der Expression im Mantel könnte beispielsweise durch eine vermehrte Enzymumsatzrate in diesem Gewebe ausgeglichen werden. Da die Aktivität dieses Funktionsträgers jedoch nicht untersucht wurde, kann dies nur vermutet werden. Offenbar ist die Kieme der Miesmuschel, gezeigt mittels Messungen an isolierten Geweben, stärker metabolisch aktiv als der Mantelrand (persönliche Mitteilung, L. Stapp). Somit könnten die verschiedenen Aktivitäten unterschiedlicher Gewebe den physiologischen Phänotyp erklären.

Tiere des gleichen Experiments zeigten eine lineare Abnahme in der Schalenlänge und -masse (Thomsen und Melzner 2010). Da das Mantelgewebe im Schalenwachstum involviert ist, sollten sich mögliche molekulare Anpassungen gerade in diesem Gewebe wiederfinden.

Markante Expressionsänderungen, die gleich oder entgegen dem linearen Abfall in der Kalzifizierung auftraten, waren jedoch nur in 2 Genen (Tyrosinase TYR1 und Chitinase), beobachtet worden. Möglicherweise handelt es sich bei diesen beiden Transkripten um essentielle Gene, die mit einer Reduktion der Kalzifizierung bei steigendem $p\text{CO}_2$ einhergehen. Viele Gene, die eine Aufgabe bei biomineralisierenden Prozessen übernehmen, sind durch art-spezifische Sequenzen gekennzeichnet (siehe Abschnitt 4.2) und können somit nicht durch Sequenzvergleiche mit anderen Organismen charakterisiert werden. Daher mögen sich diese Gene bei der GO-Einteilung (siehe Abb. 7.1-3 Anhang) bevorzugt in den Anteil der unbekannten Contigs eingliedern. Da sich aber auch die Anteile der unbekannten Transkripte im Gesamt-Manteltranskriptom nicht deutlich unterscheiden, könnte vermutet werden, dass möglicherweise nur Änderungen einzelner Transkripte für eine Reduktion im Phänotyp in Bezug auf Biomineralisierung verantwortlich sind. Auch in einer transkriptomischen Studie von larvalen Seeigeln (*Strongylocentrotus purpuratus*) war die Reduktion der Genexpression eines Spindel-Matrix-Proteins die bedeutsamste Änderung in Bezug auf Kalzifizierung und wurde von den Autoren als Erklärung für eine geringere Larvengröße unter erhöhtem $p\text{CO}_2$ diskutiert (Padilla-Gamino et al. 2013). Auch wenn solche Befunde nahelegen, dass Modifikationen des Phänotyps auf zahlenmäßig geringen Änderungen des Transkriptoms beruhen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzlich veränderte Proteinabundanzen und Enzymaktivitäten bei unveränderter Genexpression Auswirkungen auf systemische Kapazitäten haben.

Proteomische Analysen haben den Vorteil, dass sie eine Änderung in der Proteinexpression oder -modifikation aufweisen können, und somit eine regulatorische Ebene beleuchten können, die am nächsten mit der Physiologie von Organismen in Zusammenhang gebracht werden kann (Silvestre et al. 2012). Im Mantelrand waren beispielsweise zwei Kollagene in ihren Abundanzen durch erhöhten $p\text{CO}_2$ verändert. Da Gene für Kollagene in Perlmutter-sezernierenden Mantelregionen von *Pinctada maxima* und *Haliotis asinina* identifiziert werden konnten (Jackson et al. 2010), und Kollagene möglicherweise in der organischen Matrix, wie für *Haliotis laevigata* vermutet (Blank et al. 2003), lokalisiert sind, scheinen kollagene Strukturen durchaus eine Rolle bei der Kalzifizierung zu spielen. Die Abundanzen der Kollagene waren nach einer einjährigen Inkubation bei 2400 μatm am geringsten und erreichten bei 4200 μatm wieder Kontrollniveau, während eine verringerte Kalzifizierung lediglich bei 4200 μatm nachzuweisen war. Offensichtlich sind extrazelluläre Proteine, wie Kollagene und auch ein unbekanntes Protein mit einer vWFA-Domäne, besondere Zielproteine unter erhöhtem $p\text{CO}_2$, die aber in ihrer Regulation nicht direkt mit einer Änderung in der Kalzifizierung einhergehen. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass viele Transkripte (327) Mantelrand-spezifisch exprimiert waren und vermutlich in der Biomineralisierung involviert sind. Ebenso demonstrierten weitere Studien die Vielzahl von diversen putativen Biomineralisierungstranskripten in Mantelgeweben von Bivalvia und

Gastropoda (Marie et al. 2012, Clark et al. 2010, Jackson et al. 2010). Somit kann eine Änderung in den Abundanzen einer einzigen Proteingruppe (der Kollagene) nicht zwangsläufig eine reduzierte Biomineralisierung erklären.

Im Kiemengewebe waren 4 Tubuline durch erhöhten $p\text{CO}_2$ verändert: zwei von ihnen zeigten die maximalsten Abundanzen, die beiden anderen die geringsten Abundanzen unter mittlerem $p\text{CO}_2$. Da die Kieme das verantwortliche Gewebe für die Nahrungsaufnahme mittels Filtration ist, mögen Modifikationen in den Tubulinen der Filamente zu den beobachteten linearen Reduktionen in der Filtrationsrate (Publikation III) beitragen. Zytoskelettkomponenten der Kieme, und somit auch Tubuline, sind häufig durch verschiedene Stressoren wie beispielsweise $p\text{CO}_2$ (Publikation III), Hitze (Tomanek und Zuzow 2010) und Hyposalinität (Tomanek et al. 2012) modifiziert. Ebenso hatten Hitzestress und verringerte Salinitäten negative Auswirkungen auf die Filtrationsraten von *M. galloprovincialis* und *Agropecten purpuratus* (Anestis et al. 2010, Navarro und Gonzalez 1998). Zusammen mit diesen Beispielen legen die hier gewonnenen Befunde einen Zusammenhang von Tubulinmodifikationen und Änderungen in der Filtrationsrate nahe. Jedoch kann anhand der durchgeführten Experimente nicht geklärt werden, ob es sich hierbei um primäre oder sekundäre Änderungen handelt.

Mytilus-Arten sind häufig durch Hyperkapnie-bedingte Änderungen in der Ammoniumexkretion gekennzeichnet (siehe Abschnitt 4.6). Dieser Prozess wird als Mechanismus zur Ausscheidung von Säure-Äquivalenten vermutet (Lindinger et al. 1984) und ist Anzeichen einer Nutzung von Aminosäuren und Proteinen zur Energiegewinnung unter metabolischer Depression (Michaelidis et al. 2005). Im Kiemengewebe waren zwei Untereinheiten des Proteasoms, das für die Degradierung von Proteinen zuständig ist, in ihren Abundanzen durch erhöhten $p\text{CO}_2$ verringert. Ob eine verringerte Abundanz von Proteasom-Untereinheiten im direkten Zusammenhang mit einer nicht geänderten Ammoniumexkretionsrate steht, bleibt ungeklärt, da in den übrigen Studien über *Mytilus* sp. keine additiven Analysen zum Proteasom erfolgten.

Innerhalb dieser Arbeit war es möglich, proteomische und transkriptomische Antworten der Miesmuschel auf erhöhten $p\text{CO}_2$ zu vergleichen. Da jedoch das Transkriptom ausschließlich aus Mantelgewebe der Muscheln generiert wurde, konnte das Proteom der Kieme nicht für Gegenüberstellungen genutzt werden. Limitierender Faktor in den Vergleichen war zudem die geringe Anzahl der durch CO_2 geänderten und identifizierten Proteine. Somit erscheint es erklärbar, dass nur teilweise gute Korrelationen zwischen Gen- und Proteinexpression im Mantel gegeben waren. Unabhängig von der geringen Vergleichsmöglichkeit kann jedoch postuliert werden, dass einzelne Transkripte und Proteine gegenläufig, andere gleichgerichtet reguliert werden. Auch wenn keine vereinheitlichten Rückschlüsse auf Änderungen in den systemischen Kapazitäten gezogen werden können, ermöglichte diese Studie einzigartige und neuartige Einblicke in die der Physiologie unterliegenden zellulären Mechanismen, wodurch das

Verständnis von organismischen Anpassungsstrategien auf geänderte Umweltbedingungen somit massiv erweitert werden konnte.

4.6 Folgen von erhöhtem $p\text{CO}_2$ auf physiologische Mechanismen im Vergleich zu anderen *Mytilus*-Populationen

Kalzifizierung gilt als Prozess, der durch Unterschreitungen von Calciumkarbonat-Sättigungen während fortschreitender Ozeanversauerung besonders beeinträchtigt wird (Fabry et al. 2008). Da Mytilidae ihre Schalen sowohl aus Kalzit und Aragonit bilden, könnte sich ein Sinken von $[\text{CO}_3^{2-}]$ und das damit einhergehende frühzeitige Unterschreiten der Aragonitsättigung, limitierend auf die Biomineralisierung auswirken. Unter Ozeanversauerungsszenarien ist eine Reduktion der Kalzifizierung in Mytilidae bei $\Omega_{\text{arg}} < 1$ beschrieben (Thomsen und Melzner 2010, Thomsen et al. 2010, Thomsen et al. 2013, Melzner et al. 2011, Duarte et al. 2013, Publikation III), teilweise ist der Prozess der Kalifizierung jedoch trotz Aragonit-Sättigung des Seewassers negativ beeinflusst (Gazeau et al. 2007, Range et al. 2012, Rodolfo-Metalpa et al. 2011).

M. edulis aus der Kieler Förde waren nach 1-jähriger Akklimation an erhöhte $p\text{CO}_2$ -Werte (1300, 2400 und 4200 μatm) ausschließlich unter 4200 μatm durch eine reduzierte Kalzifizierung (-7% Schalenlängenwachstum, -24% Schalenmassenwachstum) charakterisiert (Publikation III). Jedoch waren die Muscheln unter allen Ozeanversauerungsszenarien in der Lage zu kalzifizieren und einen Zuwachs an Schalenlänge und -masse zu erreichen, obwohl unter diesen Bedingungen das Meerwasser sowohl an Kalzit als auch an Aragonit untersättigt war. Reduktionen im Schalenwachstum von *M. edulis* waren auch für die 2-monatige Inkubation dokumentiert, wobei unter 3700 μatm die höchsten Abnahmen in der Schalenlänge und der Schalenmasse gemessen worden waren (Thomsen und Melzner 2010). Nach kürzeren Inkubationen (7 Wochen) von juvenilen *M. edulis* war der Prozess der Biomineralisierung ausschließlich bei 3350 μatm negativ beeinflusst, bei $p\text{CO}_2$ -Werten von bis zu 2100 μatm zeigte das Schalenwachstum hingegen keinerlei Veränderungen (Thomsen et al. 2013). Gleichermäßen war in einer weiteren 7-Wochen-Studie bei niedrigen Seewasser-Temperaturen ein verringertes Schalenlängenwachstum abhängig vom $p\text{CO}_2$ bestimmt worden (Melzner et al. 2011). Hierbei ergab sich die stärkste Abnahme ebenfalls bei 4000 μatm . Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *M. edulis* nach Inkubationen von 7 Wochen bis hin zu 1 Jahr ähnliche phänotypischen Änderungen in der Kalzifizierung zeigen. Dies lässt vermuten, dass sich eine chronische Aussetzung unter stark erhöhtem $p\text{CO}_2$, wie es bei einer fortschreitenden Ozeanversauerung gegeben wäre, ebenfalls negativ auf die Kalzifizierung auswirken kann. Allerdings zeigen alle Kalzifizierungsexperimente, die mit Muscheln der *M. edulis*-Population aus der Kieler Förde ($p\text{CO}_2$ -Werte im Jahresgang zwischen 385 und 2300 μatm) durchgeführt wurden, die stärksten Reduktionen der Kalzifizierung bei Inkubationen von ca. 4000 μatm . Solch ein $p\text{CO}_2$ ist

allerdings weit entfernt von Prognosen für die nähere Zukunft, die einen maximalen atmosphärischen $p\text{CO}_2$ von 936 ppm für das Jahr 2100 vorhersagen (Meinshausen et al. 2011). In küstennahen hypoxischen Regionen können jedoch Werte bis hin zu 4500 μatm erreicht werden (Melnzer et al. 2013), sodass in diesen Regionen auch die Miesmuschel der Kieler Bucht beeinträchtigt sein würde. Im Gegensatz zu den unveränderten Kalzifizierungsraten der *M. edulis*-Population aus der Kieler Bucht bei $p\text{CO}_2 < \text{ca. } 2400 \mu\text{atm}$, war die Kalzifizierung von *M. galloprovincialis* bei ca. 2300 μatm (Rodolfo-Metalpa et al. 2011) und von *M. chilensis* aus der Huelmo Bucht vor Chile bei moderat erhöhtem $p\text{CO}_2$ (1000 μatm) verringert (Duarte et al. 2013).

Ein weiterer wichtiger Parameter im Zusammenhang mit Ozeanversauerung scheint eine adäquate Aufnahme von Nahrung zu sein. In vorherigen Studien mit *M. edulis* der Kieler Bucht konnte nachgewiesen werden, dass sich Ozeanversauerung negativer und verstärkter auswirkte, wenn Muscheln nicht ausreichend Nahrung zur Verfügung hatten (Melnzer et al. 2011), und dass eine optimale Nahrungsversorgung die Effekte von erhöhtem $p\text{CO}_2$ reduzieren kann (Thomsen et al. 2013). Jedoch wurde in diesen Studien nicht die Rate der Nahrungsaufnahme bestimmt. Im Anschluss an die einjährige Inkubation von juvenilen *M. edulis* der Kieler Förde unter erhöhtem $p\text{CO}_2$ wurde daher erstmalig die Klärungsrate dieser Population gemessen (Publikation III). Die erhobenen Daten zeigten eine $p\text{CO}_2$ -Dosis-abhängige Reduktion der Klärungsrate des Meerwassers, die einer verminderten Aufnahme von *Rhodomonas*-Zellen über Filtration durch die Kiemen entspricht. Unter höchstem $p\text{CO}_2$ nahm die Klärungsrate um 37% verglichen zu Kontrollbedingungen ab. Reduktionen in Klärungsraten sind auch für andere *Mytilus*-Arten, wie *M. chilensis* (Navarro et al. 2013) und *M. galloprovincialis* (Range et al. 2013) bestimmt worden. Interessanterweise geht eine Reduktion in der Klärungsrate oftmals mit einer verringerten Sauerstoffverbrauchsrate in Bivalvia einher (Fernandez-Reiriz et al. 2011, Liu und He 2012, Navarro et al. 2013) und mag eine limitierte Verfügbarkeit von Energieressourcen zur Nutzung für Wachstum und andere physiologische Funktionen indizieren.

Über die Gründe einer reduzierten Klärungsrate kann bislang nur spekuliert werden. Zum einen kann die Schlagrate der Kiemen durch einen stark sauren pH innerhalb weniger Minuten reduziert sein (Haywood 1925). Andererseits könnten die noch nach 1-jähriger Inkubation nachweisbaren Modifikationen des Zytoskeletts, hier besonders die der Tubuline (Publikation III), die Funktionalität der Kieme vermindern. Zudem könnte eine durch Ansäuerung hervorgerufene Änderung im Säure-Base-Haushalt die enzymatischen Funktionalitäten im Verdauungstrakt modifizieren. Da die Verdauung in Bivalvia sowohl extrazellulär im Magen als auch intrazellulär in den Zellen der Divertikel stattfindet (Owen 1966, Hawkins et al. 1983), könnte ein Anstieg im Meerwasser- $p\text{CO}_2$ den pH im Magen der Miesmuscheln erniedrigen und dadurch Aktivitäten von Verdauungsenzymen des Magens

reduzieren. Eine Abnahme in der Klärungsrate könnte somit eine sekundäre Reaktion zur Verhinderung der Akkumulierung von nicht-verdauten Nahrungspartikeln sein. In adulten Seeigeln von *Strongylocentrotus droebachiensis*, die eine nicht-kompensierte metabolische Azidose unter erhöhtem $p\text{CO}_2$ zeigten, war der Verdauungstrakt frei von Nahrungspartikeln (Stumpp et al. 2012). Für Larven des Seeigels *S. droebachiensis* konnte zudem gezeigt werden, dass der alkalische pH des Magens durch chronische Inkubation unter erniedrigtem pH (pH 7,7 und 7,4) 10 Tage nach Fertilisation um maximal 0,5 pH-Einheiten gesunken war (Stumpp et al. 2013). Da der pH der verschiedenen Abschnitte des Verdauungstrakts von *Bivalvia* einen weiten Bereich von beispielsweise 5,8-7,7 (*Ostrea edulis*, Mathers 1974) oder 4,5-6,9 (*Mya arenaria*, Yonge 1925) aufweist, mag der Einfluss eines reduzierten Meerwasser-pH jedoch eher einen geringen Einfluss auf den pH des Verdauungstrakts von *Bivalvia* haben.

Eine Reduktion im aeroben Metabolismus unter Hyperkapnie ist durch Störungen des extrazellulären pH bedingt (Reipschläger und Pörtner 1996). Sinkende Sauerstoffverbrauchsrate wurden in Langzeitinkubationen für *M. galloprovincialis* (3 Monate bei ca. 5000 μatm , Michaelidis et al. 2005) und für *M. chilensis* (70 Tage bei 676 und 982 μatm , Navarro et al. 2013) detektiert. Dagegen erfolgte in *M. galloprovincialis* (84 Tage bei bis zu 3992 μatm und 202 Tage bei 2615 μatm , Range et al. 2013) und *M. edulis* (Publikation III) keine Änderung in den Respirationsraten. *M. edulis* der Kieler Bucht zeigten nach Inkubation von 8 Wochen sogar eine erhöhte Rate unter moderaten $p\text{CO}_2$ (Thomsen und Melzner 2010). Wahrscheinlich sind die Auswirkungen von Ozeanversauerung auf Respiration abhängig von der Population und ihrem Vermögen, kompensatorisch aktiv gegen einen erhöhten $p\text{CO}_2$ zu regulieren. Die Miesmuscheln der Kieler Förde zeigten sowohl nach mittel-fristigen (8 Wochen, Thomsen und Melzner 2010) als auch im Anschluss an länger andauernde Inkubationen (1 Jahr, Publikation II) keine Reduzierungen im Sauerstoffverbrauch und waren somit nicht negativ im aeroben Metabolismus beeinflusst. Offenbar ist diese Population bis hin zu 4200 μatm in der Lage, den Energiebedarf durch annähernd konstanten oder leicht erhöhten Metabolismus zu decken.

Mytilus-Arten zeigten nach Inkubation über Stunden bis hin zu mehreren Wochen unter erhöhtem $p\text{CO}_2$ einen Anstieg in der Ammoniumexkretionsrate (Lindinger et al. 1984, Michaelidis et al. 2005, Thomsen und Melzner 2010, Fernandez-Reiriz et al. 2012, Range et al. 2013). Möglicherweise ist der Prozess einer erhöhten NH_4^+ -Exkretion bis hin zu einigen Wochen besonders von Bedeutung, die jedoch mit zunehmender Inkubationsdauer abnimmt: unter kurzzeitigen und mittelfristigen Inkubationen von 0 h bis hin zu einigen Wochen erfolgte in allen Studien ein eindeutiger Anstieg in den Raten (Lindinger et al. 1984, Michaelidis et al. 2005, Thomsen und Melzner 2010), unter mittlerer Dauer (70-84 Tage) variierten die Reaktionen (Navarro et al. 2013, Fernandez-Reiriz et al. 2012, Range et al. 2013), hingegen

zeigten länger akklimierte *Mytilus* (202 Tage bis 12 Monate) keine signifikanten Erhöhungen in der NH_4^+ -Exkretionsrate (Range et al. 2013, Publikation III).

Aus der Aufnahme von Energie durch Filtration abzüglich des Energieverlustes durch Respiration und NH_4^+ -Exkretion kann das Wachstumsvermögen berechnet werden. Es misst den Effekt der Umwelt auf die Fitness von Organismen (Bayne und Newell 1983). Sowohl für *M. chilensis* (Navarro et al. 2013) als auch für *M. edulis* (Publikation III) ist eine Reduktion des Wachstumsvermögens mit steigendem $p\text{CO}_2$ beschrieben. Andererseits war das Wachstumsvermögen in *M. galloprovincialis* unter 3790 μatm im Vergleich zu Kontrollbedingungen erhöht (Fernandez-Reiriz et al. 2012). Im Falle von *M. edulis* aus der Kieler Bucht ist die Abnahme der Fitness hauptsächlich durch eine verringerte Klärungsrate bedingt. Ein vergleichbarer Zusammenhang zwischen Abnahmen in der Filtration und dem Wachstumsvermögen wurde beispielsweise für *Ruditapes decussatus* (Sobral und Widdows 1997) und *M. galloprovincialis* (Anestis et al. 2010) hergestellt. Die Abnahme der Fitness von *M. edulis* resultierte allerdings in keinen signifikanten Änderungen im somatischen Wachstum. Daraus lässt sich folgern, dass der Standardmetabolismus trotz reduzierter Energieeinfuhr aufrecht erhalten werden kann, jedoch andere physiologische Prozesse, wie beispielsweise Kalzifizierung, beeinträchtigt sind.

Ein detaillierter Vergleich der existierenden Inkubationen, die die unterschiedlichen physiologischen Parameter in verschiedenen *Mytilus*-Arten bestimmt haben, ist jedoch nur bedingt möglich, da sich die gewählten $p\text{CO}_2$ -Stufen, die Inkubationslängen der Experimente sowie die Art und Menge der Fütterung stark unterscheiden. Zusammenfassend scheint die *M. edulis*-Population der Kieler Bucht verglichen zu anderen *Mytilus*-Arten relativ robust auf erhöhte $p\text{CO}_2$ zu reagieren. Dies mag durch mögliche evolutive Anpassungen der lokalen Population auf Grund der wiederkehrenden saisonalen Anstiege des Meerwasser- $p\text{CO}_2$ im Habitat bedingt sein. Lokale Adaptation wurde bereits für verschiedene marine Invertebraten, darunter auch *Mytilus* sp. bei anderen Umwelteinflüssen wie Temperatur und Umweltverschmutzung beobachtet (zusammengefasst in Sanford und Kelly 2011). Möglicherweise sind die Anpassungen der Miesmuschel-Population der Kieler Bucht durch *Life-History*-Merkmale oder durch epigenetische Modifikationen bedingt. Somit könnten diese Miesmuscheln, ohne dass sie genetische Unterschiede gegenüber anderen Populationen zeigen, in der Lage sein, besser als Muscheln anderer Populationen auf erhöhten $p\text{CO}_2$ zu reagieren.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Biomineralisierung ist oftmals durch Ozeanversauerung negativ betroffen. Innerhalb dieser Studie wurden daher die molekularen Mechanismen, die dem Prozess der Biomineralisierung in *M. edulis* zugrunde liegen, beleuchtet. Die Vielzahl der im Mantel entdeckten und möglicherweise in der Kalzifizierung involvierten Gene unterstreicht die

Komplexität der Biomineralisierung. Teilweise waren Transkripte mit bekannten und somit beschriebenen Funktionen aus Kalzifizierern, wie z.B. Nacrein, Tyrosinasen und Chitinsynthasen, auch im Manteltranskriptom vorhanden. Darüber hinaus konnten jedoch auch in großem Maße spezifische und uncharakterisierte Transkripte aus *M. edulis* identifiziert werden. Da bislang nur von einigen ausgewählten Transkripten die Zuordnung ihrer Funktion in der Regenerationszeit-abhängigen Schalenneusynthese erfolgte, sollte in zukünftigen Studien eine umfassendere Auswahl an Transkripten untersucht werden. Als Analyse-Tool hierfür würden sich weitere RNA-Sequenzierungen (beispielsweise *Illumina* basierend) von zentralem Mantelgewebe angebohrter Muscheln anbieten. Hierbei kann das bereits vorhandene Transkriptom aus Mantelgewebe als Rückgrat zum Assemblieren und Zuordnen der durch *Illumina*-Sequenzierung entstandenen kürzeren Reads genutzt werden. Durch die höhere Anzahl der durch *Illumina*-Sequenzierung generierten Reads kann eine größere Sequenzierungstiefe und höhere Abdeckung der Transkripte erreicht werden, so dass die quantitativen Analysen der Transkripte in besserem Maße erfolgen als auf Basis der hier verwendeten *454 pyrosequencing*-Technologie.

Ein erhöhter $p\text{CO}_2$ führte zu Änderungen in der Genexpression, des Proteoms und physiologischer Prozesse. Da die hier erzielten Ergebnisse bezüglich der Korrelationen zwischen Genexpression, Proteom und physiologischen Kapazitäten oftmals noch nicht zusammenhängend erklärt werden können, sollten in zukünftigen Studien diese Regulationsebenen weiter untersucht werden. Um eine optimale Analyse von transkriptionalen und translationalen bzw. post-translationalen Regulationen und Modifikationen zu gewährleisten, könnten bei genügend Probenmaterial zukünftig gekoppelte Studien, die die Methoden innerhalb eines Experiments vereinen, durchgeführt werden. Hierdurch ließe sich feststellen, welche Transkripte in der Genexpression verändert werden, und ob diese die Expression von Proteinen modifizieren können. In der hier vorliegenden Studie konnten nur Vergleiche zwischen Genexpression und dem Proteom nach Inkubation der Tiere unter höchstem $p\text{CO}_2$ (3700 und 4200 μatm) gezogen werden. Da bei dieser $p\text{CO}_2$ -Stufe nur geringe regulatorische Anpassungen erfolgten, sollten in zukünftigen Studien geringere $p\text{CO}_2$ gewählt werden.

Durch den Vergleich der physiologischen Anpassungen verschiedener *Mytilus*-Populationen wurde verdeutlicht, dass die Miesmuschel der Kieler Förde besonders robust gegenüber erhöhten $p\text{CO}_2$ reagiert. Dies legt eine lokale und evolutive Anpassung der Miesmuschel in ihrem Habitat nahe. Möglicherweise beruht dies auf epigenetische Mechanismen oder unterschiedlicher Ontogenese. Unter diesem Aspekt ist es von Interesse, die Geschwindigkeit der Anpassungen zu bestimmen. Hierfür könnten Mehr-Generationen-Experimente einen wichtigen Beitrag leisten, da durch sie bessere Prognosen für die Zukunft gestellt werden können, als es klassische Akklimationsexperimente vermögen. Daher sollten in

zukünftigen Studien physiologische Daten aller Entwicklungsphasen der Miesmuschel erhoben werden. Hierbei könnten folgende Versuchsansätze unterschieden werden: 1. Akklimation von Eiern und Inkubation der nachfolgenden Entwicklungsstufen, 2. Inkubation der Eltern-Generation und Abbläichen unter erhöhtem $p\text{CO}_2$ mit anschließender Inkubation der Eier, Larven, Juvenilen und Adulten. Desweiteren würde ein Mehr-Generationen-Experiment besser dem zeitlichen Verlauf einer fortschreitenden Ozeanversauerung entsprechen. Physiologische Messungen sollten Überleben, Entwicklung, Kalzifizierung, Filtrationsleistung, Sauerstoffverbrauch und Ammoniumexkretion der verschiedenen Entwicklungsphasen abdecken, um ein umfassendes Bild der Auswirkungen durch einen erhöhten $p\text{CO}_2$ geben zu können. Durch diesen Versuchsansatz ließe sich letztendlich auch die sensitivste Entwicklungsphase der Miesmuschel aus der Kieler Förde ermitteln.

Bislang sind Studien rar, die die Auswirkungen von Ozeanversauerung auf *Mytilus*-Populationen aus der angrenzenden Nordsee, die nur durch geringe Schwankungen im Oberflächen- $p\text{CO}_2$ gekennzeichnet ist (Thomas et al. 2005), untersucht haben. In einer Kurzzeit-Studie wurden bereits Respiration, Herzschlag, anaerobe Metabolite und Säure-Base-Parameter der Hämolymphe unter erhöhtem $p\text{CO}_2$ und Temperaturerwärmung gemessen (Zittier et al. eingereicht). Diese Parameter waren jedoch nur marginal durch Ozeanversauerung beeinflusst (Zittier et al. eingereicht). Da die Kalzifizierungsrate ein gutes Maß für die Messbarkeit von Ozeanversauerungseffekten darstellt, sollte dieser Parameter auch in Nordsee-Populationen untersucht werden. Es ist damit zu rechnen, dass Organismen der Nordsee möglicherweise sensibler als Organismen reagieren, die jahreszeitlich bedingt Fluktuationen im Meerwasser-pH ausgesetzt sind. Vergleiche von Kalzifizierungseffekten verschiedener Populationen im Hinblick auf ihre Habitate könnten verstärkt populationspezifische Sensitivitäten herausstellen.

Da zukünftig nicht nur mit steigendem $p\text{CO}_2$, sondern auch mit Erwärmungen des Klimas zu rechnen ist (Pörtner et al. 2005, Pörtner 2008), könnten sich diese beiden Stressoren synergistisch auf die Miesmuschel auswirken. Eine reduzierte temperaturbedingte Klärungsrate, wie bereits für *M. galloprovincialis* gezeigt (Anestis et al. 2010), könnte die Kieler *Mytilus*-Population zusätzlich zur durch Ozeanversauerung hervorgerufenen verringerten Filtration verstärkt negativ im Wachstum, der Entwicklung und Reproduktion beeinflussen. Zusätzlich zu systemischen Modifikationen gegenüber Temperatur und $p\text{CO}_2$ könnten auch transkriptionale Anpassungen erfolgen. Bei *Pinctada fucata* resultierte beispielsweise der synergistische Einfluss von Temperaturanstieg und erhöhtem $p\text{CO}_2$ in einer Reduktion der Expression von Genen für Biomineralisierung (Liu et al. 2012). Eine Studie, die den Einfluss von erhöhtem Meerwasser- $p\text{CO}_2$ und Temperatur auf Schalenwachstum und -stabilität, sowie Kondition und zellulären Stress auf *M. edulis* der Kieler Bucht untersucht, existiert bereits (Hiebenthal et al. 2013). Darin konnte dargestellt werden, dass die Tiere sensibler auf stark erhöhte Temperaturen als auf erhöhten $p\text{CO}_2$ reagierten (Hiebenthal et al. 2013). Daher bleibt zu

untersuchen, wie sich Temperaturerhöhungen und erhöhter $p\text{CO}_2$ in Kombination auf weitere physiologische Prozesse und die Genexpression der Miesmuschel aus der Kieler Bucht auswirken. Außerdem ist ungeklärt, welche zusätzlichen Prozesse gleichermaßen synergistisch beeinflusst sind, oder ob manche bevorzugt durch erhöhten $p\text{CO}_2$, andere durch einen Anstieg in der Temperatur bedingt sind.

M. edulis aus der Kieler Bucht zeigten die häufigsten transkriptionalen und (post-) translationalen Antworten und Modifikationen unter moderat erhöhten $p\text{CO}_2$, die denen während Auftrieb von Tiefenwassern in ihrem natürlichen Habitat entsprechen. Daher ist zu vermuten, dass sessile *M. edulis* dieser Population zusätzlich zu natürlichen Schwankungen längerfristig einem durch moderate Ozeanversauerung erhöhten Meerwasser- $p\text{CO}_2$ standhalten können. Ob verschiedene Lebensstadien von *M. edulis* jedoch auch chronische Erniedrigungen des pH tolerieren können, wenn diese die prognostizierten Werte für das Jahr 2100 weit übersteigen, bleibt zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F., Weiner, S. (2006). Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chemistry* 12(4), 980-987.
- Allan, B. J. M., Domenici, P., McCormick, M. I., Watson, S.-A., Munday, P. L. (2013). Elevated CO₂ affects predator-prey interactions through altered performance. *PLoS ONE* 8(3): e58520. doi:10.1371/journal.pone.0058520
- Andersen, S., Grefsrud, E. S., Harboe, T. (2013). Effect of increased pCO₂ on early shell development in great scallop (*Pecten maximus* Lamarck) larvae. *Biogeosciences Discussions* 10, 3281-3310. DOI:10.5194/bgd-10-3281-2013
- Anestis, A., Pörtner, H.-O., Karagiannis, D., Angelidis, P., Staikou, A., Michaelidis, B. (2010). Responses of *Mytilus galloprovincialis* (L.) to increasing seawater temperature and to marteliosis: Metabolic and physiological parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 156, 57-66.
- Asmus, H. (1987). Secondary production of an intertidal mussel bed community related to its storage and turnover compartments. *Marine Ecology Progress Series* 39, 251-266.
- Baker, D. W., Matey, V., Huynh, K. T., Wilson, J. M., Morgan, J. D., Brauner, C. J. (2009). Complete intracellular pH protection during extracellular pH depression is associated with hypercarbia tolerance in white sturgeon, *Acipenser transmonatus*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 296, R1868-R1880.
- Bayne, B. L., Newell, R. C. (1983). Physiological energetics in marine molluscs. *Mollusca* 4, 409-515.
- Bechmann, R. K., Taban, I. C., Westerlund, S., Godal, B. F., Arnberg, M., Vingen, S., Ingvarsdottir, A., Baussant, T. (2011). Effects of ocean acidification on early life stages of shrimp (*Pandalus borealis*) and mussel (*Mytilus edulis*). *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 74, 424-438.
- Beedham, G. E. (1958). Observations on the mantle of Lamellibranchia. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 99(2), 181-197.
- Beesley, A., Lowe, D. M., Pascoe, C. K., Widdicombe, S. (2008). Effect of CO₂-induced seawater acidification on the health of *Mytilus edulis*. *Climate Research* 37, 215-225.
- Beniash, E., Aizenberg, J., Addadi, L., Weiner, S. (1997). Amorphous calcium carbonate transforms into calcite during sea urchin larval spicule growth. *Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences* 264(1380), 461-465.
- Beniash, E., Ivanina, A., Lieb, N. S., Kurochkin, I., Sokolova, I. M. (2010). Elevated level of carbon dioxide affects metabolism and shell formation in oysters *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series* 419, 95-108.
- Berner, R. A. (1965). Activity coefficients of bicarbonate, carbonate and calcium ions in sea water. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 29, 947-965.
- Bibby, R., Cleall-Harding, P., Rundle, S., Widdicombe, S., Spicer, J. (2007). Ocean acidification disrupts induced defences in the intertidal gastropod *Littorina littorea*. *Biology Letters* 3, 699-701.

- Bibby, R., Widdicombe, S., Parry, H., Spicer, J., Pipe, R. (2008). Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Biology* 2, 67-74.
- Blank, S., Arnoldi, M., Khoshnavaz, S., Treccani, L., Kuntz, M., Mann, K., Grathwohl, G., Fritz, M. (2003). The nacre protein perlucin nucleates growth of calcium carbonate crystals. *Journal of Microscopy* 212, 280-291.
- Brenko, M. H., Calabrese, A. (1969). The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 4, 224-226.
- Caldeira, K., Wickett, M. E. (2005). Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *Journal of Geophysical Research* 110 C09S04, 1-12.
- Cao, L., Caldeira, K. (2008). Atmospheric CO₂ stabilization and ocean acidification. *Geophysical Research Letters* 35, L19609.
- Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J. A., Bulet, P. (1996). Innate immunity - Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *The Journal of Biological Chemistry* 271(36), 21808-21813.
- Checa, A. (2000). A new model for periostracum and shell formation in Unionidae (Bivalvia, Mollusca) *Tissue Cell* 32(5), 405-416.
- Cigliano, M., Gambi, M. C., Rodolfo-Metalpa, R., Patti, F. P., Hall-Spencer, J. M. (2010). Effects of ocean acidification on invertebrate settlement at volcanic CO₂ vents. *Marine Biology* 157, 2489-2502.
- Clark, K.R., Gorley, R. N. (2001). PRIMER v5: User manual/tutorial, PRIMER-E, Plymouth UK.
- Clark, D., Lamare, M., Barker, M. (2009). Response of sea urchin pluteus larvae (Echinodermata: Echinoidea) to reduced seawater pH: a comparison among a tropical, temperate, and a polar species. *Marine Biology* 156, 1125-1137.
- Clark, M. S., Thorne, M. A. S., Vieira, F. A., Cardoso, J. C. R., Power, D. M., Peck, L. S. (2010). Insights into shell deposition in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* gene discovery in the mantle transcriptome using 454 pyrosequencing. *BMC Genomics* 11, 362
- Collino, S., Kim, I. W., Evans, J. S. (2006). Identification of an "acidic" C-terminal mineral modification sequence from the mollusk shell protein Asprich. *Crystal Growth & Design* 6 (4), 839-842.
- Comeau, S., Gorsky, G., Teyssie, J.-L., Gattuso, J.-P. (2009). Impact of ocean acidification on a key Arctic pelagic mollusc (*Limacina helicina*). *Biogeosciences* 6, 1877-1882.
- Craft, J. A., Gilbert, J. A., Temperton, B., Dempsey, K. E., Ashelford, K., Tiwari, B., Hutchinson, T. H., Chipman, J. K. (2010). Pyrosequencing of *Mytilus galloprovincialis* cDNAs: tissue-specific expression patterns. *PLoS ONE* 5(1): e8875. doi:10.1371/journal.pone.0008875.
- Crenshaw, M. A. (1972). The soluble matrix from *Mercenaria mercenaria* shell. *Biom mineralization* 6, 6-11.
- Cripps, I. L., Munday, P. L., McCormick, M. I. (2011). Ocean acidification affects prey detection by a predatory reef fish. *PLoS ONE* 6(7): e22736. doi:10.1371/journal.pone.0022736.

- Cummings, V., Hewitt, J., Van Rooyen, A., Currie, K., Beard, S., Thrush, S., Norkko, J., Barr, N., Heath, P., Halliday, N. J., Sedcole, R., Gomez, A., McGraw, C., Metcalf, V. (2011). Ocean acidification at high latitudes: potential effects on functioning of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. PLoS ONE 6(1): e16069. doi:10.1371/journal.pone.0016069.
- Cusack, M., Freer, A. (2008). Biomineralization: elemental and organic influence in carbonate systems. Chemical Reviews 108, 4433-4454.
- Degens, E. T. (1976). Molecular mechanisms on carbonate, phosphate, and silica deposition in the living cell, In: Topics in current chemistry, Vol. 64, pp. 1-112, Springer Verlag.
- Deigweier, K., Koschnick, N., Pörtner, H.-O., Lucassen, M. (2008). Acclimation of ion regulatory capacities in gills of marine fish under environmental hypercapnia. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 295, R1660-R1670.
- de la Haye, K. L., Spicer, J. I., Widdicombe, S., Briffa, M. (2012). Reduced pH sea water disrupts chemo-responsive behaviour in an intertidal crustacean. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 412, 134-140.
- Dellile, B., Harlay, J., Zondervan, I., Jacquet, S., Chou, L., Wollast, R., Bellerby, R. G. J., Frankignoulle, M., Borges, A. V., Riebesell, U., Gattuso, J.-P. (2005). Response of primary production and calcification to changes of $p\text{CO}_2$ during experimental blooms of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi*. Global Biogeochemical Cycles 19, GB2023, doi:10.1029/2004GB002318.
- Devine, B. M., Munday, P. L., Jones, G. P. (2012a). Homing ability of adult cardinalfish is affected by elevated carbon dioxide. Oecologia 168, 269-276.
- Devine, B. M., Munday, P. L., Jones, G. P. (2012b). Rising CO_2 concentrations affect settlement behaviour of larval damselfishes. Coral Reefs 31, 229-238.
- De Wit, P., Palumbi, S. (2013). Transcriptome-wide polymorphisms of red abalone (*Haliotis rufescens*) reveal patterns of gene flow and local adaptation. Molecular Ecology 22, 2884-2897.
- Doney, S. C., Fabry, V. J., Feely, R. A., Kleypas, J. A. (2009). Ocean acidification: the other CO_2 problem. Annual Review of Marine Science 1, 169-192.
- Duarte, C., Navarro, J. M., Acuna, K., Torres, R., Manriquez, P. H., Lardies, M. A., Vargas, C. A., Lagos, N. A., Aguilera, V. (2013). Combined effects of temperature and ocean acidification on the juvenile individuals of the mussel *Mytilus chilensis*. Journal of Sea Research, <http://dx.doi.org/10.1016/j.seares.2013.06.002>
- Enderlein, P., Wahl, M. (2004). Dominance of blue mussels versus consumer-mediated enhancement of benthic diversity. Journal of Sea Research 51, 145-155.
- Erben, H. K. (1972). Über die Bildung und das Wachstum von Perlmutter. Biomineralization 4, 15-46.
- Fabry, V. J., Seibel, B. A., Feely, R. A., Orr, J. C. (2008). Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. ICES Journal of Marine Science 65, 414-432.
- Falini, G., Albeck, S., Weiner, S., Addadi, L. (1996). Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. Science 271, 67-69.
- Farre, B., Dauphin, Y. (2009). Lipids from the nacreous and prismatic layers of two Pteriomorpha mollusc shells. Comparative Biochemistry and Physiology B 152, 103-109.

Feely, R. A., Sabine, C. L., Lee, K., Berelson, W., Kleypas, J., Fabry, V. J., Millero, F. J. (2004). Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans. *Science* 305, 362-366.

Feely, R. A., Sabine, C. L., Hernandez-Ayon, J. M., Ianson, D., Hales, B. (2008). Evidence for upwelling of corrosive "acidified" water onto the continental shelf. *Science* 320, 1490-1492.

Fernandez-Reiriz, M. J., Range, P., Alvarez-Salgado, X. A., Espinosa, J., Labarta, U. (2012). Tolerance of juvenile *Mytilus galloprovincialis* to experimental seawater acidification. *Marine Ecology Progress Series* 454, 65-74.

Fernandez-Reiriz, M. J., Range, P., Alvarez-Salgado, X. A., Labarta, U. (2011). Physiological energetics of juvenile clams *Ruditapes decussatus* in a high CO₂ coastal ocean. *Marine Ecology Progress Series* 433, 97-105.

Ferrari, M. C. O., McCormick, M. I., Munday, P. L., Meekan, M. G., Dixon, D. L., Lönnstedt, O., Chivers, D. P. (2012). Effects of ocean acidification on visual risk assessment in coral reef fishes. *Functional Ecology* 26, 553-558.

Findlay, H. S., Kendall, M. A., Spicer, J. I., Widdicombe, S. (2009). Future high CO₂ in the intertidal may compromise adult barnacle *Semibalanus balanoides* survival and embryonic development rate. *Marine Ecology Progress Series* 389, 193-202.

Forrest, A. R. R., Carninci, P. (2009). Whole genome transcriptome analysis. *RNA Biology* 6(2), 107-112.

Fountoulakis, M., Suter, L. (2002). Proteomic analysis of rat liver. *Journal of Chromatography B* 782, 197-218.

Friedli, H., Lötscher, H., Oeschger, H., Siegenthaler, U., Stauffer, B. (1986). Ice core record of the ¹³C/¹²C ratio of atmospheric CO₂ in the past two centuries. *Nature* 324, 237-238.

Futcher, B., Latter, G. I., Monardo, P., McLaughlin, C. S., Garrels, J. I. (1999). A sampling of yeast proteome. *Molecular and Cellular Biology* 19(11), 7257-7368.

Gardner, L. D., Mills, D., Wiegand, A., Leavesley, D., Elizur, A. (2011). Spatial analysis of biomineralization associated gene expression from the mantle organ of the pearl oyster *Pinctada maxima*. *BMC Genomics* 12:455.

Gattuso, J.-P., Frankignoulle, M., Bourge, I., Romaine, S., Buddemeier, R. W. (1998). Effect of calcium carbonate saturation of seawater on coral calcification. *Global and Planetary Change* 18, 37-46.

Gaylord, B., Hill, T. M., Sanford, E., Lenz, E. A., Jacobs, L. A., Sato, K. N., Russell, A. D., Hettinger, A. (2011). Functional impacts of ocean acidification in an ecologically critical foundation species. *The Journal of Experimental Biology* 214, 2586-2594.

Gazeau, F., Gattuso, J.-P., Dawber, C., Pronker, A. E., Peene, F., Peene, J., Heip, C. H. R., Middelburg, J. J. (2010). Effect of ocean acidification on the early life stages of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biogeosciences* 7, 2051-2060.

Gazeau, F., Parker, L. M., Comeau, S., Gattuso, J.-P., O'Connor, W. A., Martin, S., Pörtner, H.-O., Ross, P. M. (2013). Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Marine Biology* 160, 2207-2245.

- Gazeau, F., Quiblier, C., Jansen, J. M., Gattuso, J.-P., Middelburg, J. J., Heip, C. H. R. (2007). Impact of elevated CO₂ on shellfish calcification. *Geophysical Research Letters* 34, L07603.
- Gonzalez-Bernat, M. J., Lamare, M., Barker, M. (2013). Effects of reduced seawater pH on fertilisation, embryogenesis and larval development in the Antarctic seastar *Odontaster validus*. *Polar Biology* 36, 235-247.
- Gotliv, B.-A., Kessler, N., Sumerel, J. L., Morse, D. E., Tuross, N., Addadi, L., Weiner, S. (2005). Asprich: a novel aspartic acid-rich protein family from the prismatic shell matrix of the bivalve *Atrina rigida*. *Chembiochem* 6(2), 304-314.
- Gracey, A. Y., Chaney, M. L., Boomhower, J. P., Tyburczy, W. R., Kwasi, C., Somero, G. N. (2008). Rhythms of gene expression in a fluctuating intertidal environment. *Current Biology* 18, 1501-1507.
- Gregoire, C. (1972). Structure of the molluscan shell. In: *Chemical Zoology*, Vol. VII, Mollusca (M. Florkin, B.T. Scheer, eds.), pp.45-102. Academic Press, New York.
- Gregoire, C. (1957). Topography of the organic components in mother-of-pearl. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 3(5), 797-808.
- Grotzinger, J. P. (1989). Facies and evolution of precambrian carbonate depositional systems - emergency of the modern platform archetype. In: *Controls on carbonate platform and basin development*, Vol. 44, pp. 79-106.
- Guppy, M., Withers, P. (1999). Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biological Reviews* 74, 1-40.
- Gutowska, M. A., Melzner, F., Langenbuch, M., Bock, C., Claireaux, G., Pörtner, H.-O. (2010). Acid-base regulatory ability of the cephalopod (*Sepia officinalis*) in response to environmental hypercapnia. *Journal of Comparative Physiology B* 180, 323-335.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., Aebersold, R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology* 19(3), 1720-1730.
- Habermann, J. K., Paulsen, U., Roblick, U. J., Upender, M. B., McShane, L. M., Korn, E. L., Wangsa, D., Krüger, S., Duchrow, M., Bruch, H.-P., Auer, G., Ried, T. (2007). Stage-specific alterations of the genome, transcriptome, and proteome during colorectal carcinogenesis. *Genes, Chromosomes & Cancer* 44, 10-26.
- Hack, C. J. (2004). Integrated transcriptome and proteome data: the challenges ahead. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 3(3), 212-219.
- Hall-Spencer, J. M., Rodolfo-Metalpa, R., Martin, S., Ransome, E., Fine, M., Turner, S. M., Rowley, S. J., Tedesco, D., Buia, M.-C. (2008). Volcanic carbon dioxide vents show ecosystem effects of ocean acidification. *Nature* 454, 96-99.
- Hand, S. C., Hardewig, I (1996). Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: Mechanisms and implications. *Annual Review of Physiology* 58, 539-563.
- Hawkins, A. J. S., Bayne, B. L., Clarke, K. R. (1983). Co-ordinated rhythms of digestion, absorption and excretion in *Mytilus edulis* (Bivalvia: Mollusca). *Marine Biology* 74, 41-48.
- Haywood, C. (1925). The relative importance of pH and carbon dioxide tension in determining the cessation of ciliary movement in acidified sea water. *The Journal of General Physiology* 7(6), 693-697.

- Hiebenthal, C., Philipp, E. E. R., Eisenhauer, A., Wahl, M. (2013). Effects of seawater $p\text{CO}_2$ and temperature on shell growth, shell, stability, condition and cellular stress of Western Baltic Sea *Mytilus edulis* (L.) and *Arctica islandica* (L.). *Marine Biology* 160, 2073-2087.
- Hilbish, T. J., Carson, E. W., Plante, J. R., Weaver, L. A., Gilg, M. R. (2002). Distribution of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and their hybrids in open-coast populations of mussels in southwestern England. *Marine Biology* 140, 137-142.
- Hofmann, G. E., Burnaford, J. L., Fielman, K. T. (2005). Genomics-fueled approaches to current challenges in marine ecology. *TRENDS in Ecology and Evolution* 20(6), 305-311.
- Holmes, R. M., Aminot, A., K  rouel, R., Hooker, B. A., Peterson, B. J. (1999). A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 1801-1808.
- Huan, P., Wang, H., Liu, B. (2013). Identification of a tyrosinase gene potentially involved in early larval shell biogenesis of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Development, Genes and Evolution*. doi: 10.1007/s00427-013-0450-z.
- Hudson, J. D. (1967). Speculations on the depth relations of calcium carbonate solution in recent and ancient seas. *Marine Geology* 5, 473-480.
- Ismar, S. M. H., Hansen, T., Sommer, U. (2008). Effect of food concentration and type of diet on *Acartia* survival and naupliar development. *Marine Biology* 154, 335-343.
- Jacob, D. E., Wirth, R., Soldati, A. L., Wehrmeister, U., Schreiber, A. (2011). Amorphous calcium carbonate in the shells of adult *Unionoida*. *Journal of Structural Biology* 173, 241-249.
- Jackson, D. J., McDougall, C., Green, K., Simpson, F., W  rheide, G., Degnan, B. M. (2006). A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell. *BMC Biology* 4:40.
- Jackson, D. J., McDougall, C., Woodcroft, B., Moase, B., Rose, R. A., Kube, M., Reinhardt, R., Rokhsar, D. S., Montagnani, C., Joubert, C., Piquemal D., Degnan, B. M. (2010). Parallel evolution of nacre building gene sets in molluscs. *Molecular Biology and Evolution* 27(3), 591-608.
- Jackson, R. B., Linder, C. R., Lynch, M., Purugganan, M., Somerville, S., Thayer, S. S. (2002). Linking molecular insight and ecological research. *TRENDS in Ecology and Evolution* 17(9), 409-414.
- Jutfelt, F., Bresolin de Souza, K., Vuylsteke, A., Sturve, J. (2013). Behavioural disturbances in a temperate fish exposed to sustained high- CO_2 levels. *PLoS ONE* 8(6): e65825. doi:10.1371/journal.pone.0065825.
- Kanwisher, J. W. (1955). Freezing in intertidal animals. *Biological Bulletin* 109, 56-63.
- Kautsky, N., Evans, S. (1987). Role of biodeposition by *Mytilus edulis* in the circulation of matter and nutrients in a Baltic coast ecosystem. *Marine Ecology Progress Series* 38, 201-212.
- Kautsky, H. (1989). Quantitative distribution of plant and animal communities of the phytobenthic zone in the Baltic Sea. *Contributions from the Ask   Laboratory, University of Stockholm, Sweden, Number 35*, pp. 1-80.

- Kawaguchi, T., Watabe, N. (1993). The organic matrices of the shell of the American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 170(1), 11-28.
- Keppel, E. A., Scrosati, R. A., Courtenay, S. C. (2012). Ocean acidification decreases growth and development in American lobster (*Homarus americanus*) larvae. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 44, 61-66.
- Kettman, J. R., Frey, J. R., Lefkovits, I. (2001). Proteome, transcriptome and genome: top down or bottom up analysis? *Biomolecular Engineering* 18, 207-212.
- Kjørboe, T., Møhlenberg, F., Nøhr, O. (1981). Effect of suspended bottom material on growth and energetics in *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 61, 283-288.
- Knoll, A. H. (2003). Biomineralization and evolutionary history. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54, 329-356.
- Knoll, A. H., Fairchild, I. J., Swett, K. (1993). Calcified microbes in neoproterozoic carbonates: implications for our understanding of the proterozoic/cambrian transition. *Palaios* 8, 512-525.
- Krauss, W. (2001). Baltic sea circulation. doi:10.1006/rwos.2001.0381.
- Kroeker, K. J., Kordas, R. L., Crim, R. N., Singh, G. G. (2010). Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecology Letters* 13, 1419-1434.
- Kroeker, K. J., Micheli, F., Gambi, M. C., Martz, T. R. (2011). Divergent ecosystem responses within a benthic marine community to ocean acidification. *PNAS* 108 (35), 14515-14520.
- Kurihara, H. (2008). Effects of CO₂-driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. *Marine Ecology Progress Series* 373, 275-284.
- Kurihara, H., Asai, T., Kato, S., Ishimatsu, A. (2008). Effects of elevated pCO₂ on early development in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Biology* 4, 225-233.
- Kuroyanagi, A., Kawahata, H., Suzuki, A., Fujita, K., Irie, T. (2009). Impacts of ocean acidification on large benthic foraminifers: results from laboratory experiments. *Marine Micropaleontology* 73, 190-195.
- Langenbuch, M., Pörtner, H.-O. (2004). High sensitivity to chronically elevated CO₂ levels in a eurybathic marine sipunculid. *Aquatic Toxicology* 70, 55-61.
- Larsen, B. K., Pörtner, H.-O., Jensen, F. B. (1997). Extra- and intracellular acid-base balance and ionic regulation in cod (*Gadus morhua*) during combined and isolated exposures to hypercapnia and copper. *Marine Biology* 128, 337-346.
- Lehmann, A., Krauss, W., Hinrichsen, H.-H. (2002). Effects of remote and local atmospheric forcing on circulation and upwelling in the Baltic Sea. *Tellus* 54A, 29-316.
- Levi-Kalishman, Y., Falini, G., Addadi, L., Weiner, S. (2001). Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using cryo-TEM. *Journal of Structural Biology* 135, 8-17.
- Lindinger, M. I., Laurén, D. J., McDonald, D. G. (1984). Acid-base balance in the sea mussel, *Mytilus edulis*. III. Effects of environmental hypercapnia on intra- and extracellular acid-base balance. *Marine Biology Letters* 5, 371-381.

- Lischka, S., Büdenbender, J., Boxhammer, T., Riebesell, U. (2011). Impact of ocean acidification and elevated temperatures on early juveniles of the polar shelled pteropod *Limacina helicina*: mortality, shell degradation, and shell growth. *Biogeosciences* 8, 919-932.
- Liu, W., He, M. (2012). Effects of ocean acidification on the metabolic rates of three species of bivalve from southern coast of China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 30(2), 206-211.
- Liu, W., Huang, X., Lin, J., He, M. (2012). Seawater acidification and elevated temperature affect gene expression patterns of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *PLoS ONE* 7(3): e33679. doi:10.1371/journal.pone.0033679.
- Lockwood, B. L., Sanders, J. G., Somero, G. N. (2010). Transcriptomic responses to heat stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*): molecular correlates of invasive success. *The Journal of Experimental Biology* 213, 3548-3558.
- Lockwood, B. L., Somero, G. N. (2011). Transcriptomic responses to salinity stress in invasive and native blue mussel (genus *Mytilus*). *Molecular Ecology* 20, 517-529.
- Lombard, F., da Rocha, R. E., Bijma, J., Gattuso, J.-P. (2010). Effect of carbonate ion concentration and irradiance on calcification in planktonic foraminifera. *Biogeosciences* 7, 247-255.
- Lowe, D. R. (1980). Stromatolites 3,400-myr old from the Archean of Western Australia. *Nature* 284, 441-443.
- Lowenstam, H. A. (1981). Minerals formed by organisms. *Science* 211, 1126-1131.
- Lowenstam, H. A., Margulis, L. (1980). Evolutionary prerequisites for early phanerozoic calcareous skeletons. *Biosystems* 12(1-2), 27-41.
- Maier, C., Hegeman, J., Weinbauer, M. G., Gattuso, J.-P. (2009). Calcification of the cold-water coral *Lophelia pertusa* under ambient and reduced pH. *Biogeosciences* 6, 1671-1680.
- Marie, B., Joubert, C., Tayalé, A., Zanella-Cléon, I., Belliard, C., Piquemal, D., Cochenne-Laureau, N., Marin, F., Gueguen, Y., Montagnani, C. (2012). Different secretory repertoires control the biomineralization processes of prism and nacre deposition of the pearl oyster shell. *PNAS* 109(51), 20986-20991.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B., Medakovic, D. (2007). Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Current Topics in Developmental Biology* 80, 209-276.
- Marin, F., Smith, M., Isa, Y., Muyzer, G., Westbroek, P. (1996). Skeletal matrices, mucins, and the origin of invertebrate calcification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(4), 1554-1559.
- Martin, S., Gattuso, J.-P. (2009). Response of Mediterranean coralline algae to ocean acidification and elevated temperature. *Global Change Biology* 15(8), 2089-2100.
- Martin, S., Richier, S., Pedrotti, M.-L., Dupont, S., Castejon, C., Gerakis, Y., Kerros, M.-E., Oberhänsli, F., Teyssié, J.-L., Jeffree, R., Gattuso, J.-P. (2011). Early development and molecular plasticity in the Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus* exposed to CO₂-driven acidification. *The Journal of Experimental Biology* 214, 1357-1368.
- Mata, J., Marguerat, S., Bähler, J. (2005). Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *TRENDS in Biochemical Sciences* 30(9), 506-514.

- Mathers, N. F. (1974). Digestion and pH variation in two species of oysters. *Proceedings of the Malacological Society of London* 41, 37-40.
- McConnaughey, T. A., Gillikin, D. P. (2008). Carbon isotopes in mollusk shell carbonates. *Geo-Marine Letters* 28(5-6), 287-299.
- Medacovic, D., Popovic, S., Grzeta, B., Plazonic, M., Hrs-Brenko, M. (1997). X-ray diffraction study of calcification processes in embryos and larvae of the brooding oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology* 129, 615-623.
- Meenakshi, V. R., Hare, P. E., Wilbur, K. M. (1971). Amino acids of the organic matrix of neogastropod shells. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 40(4), 1037-1043.
- Meinshausen, M., Smith, S. J., Calvin, K., Daniel, J. S., Kainuma, M. L. T., Lamarque, J.-F., Matsumoto, K., Montzka, S. A., Raper, S. C. B., Riahi, K., Thomson, A., Velders, G. J. M., van Vuuren, D. P. P. (2011). The RCP greenhouse gas concentrations and their extensions from 1765 to 2300. *Climate Change* 109, 213-241.
- Melatunan, S., Calosi, P., Rundle, S. D., Moody, A. J., Widdicombe, S. (2011). Exposure to elevated temperature and P_{CO_2} reduces respiration rate and energy status in the periwinkle *Littorina littorea*. *Physiological and Biochemical Zoology* 84(6), 583-594.
- Melzner, F., Gutowska, M. A., Langenbuch, M., Dupont, S., Lucassen, M., Thorndyke, M. C., Bleich, M., Pörtner, H.-O. (2009). Physiological basis for high CO_2 tolerance in marine ectothermic animals: pre-adaptation through lifestyle and ontogeny? *Biogeosciences* 6, 2313-2331.
- Melzner, F., Stange, P., Trübenbach, K., Thomsen, J., Casties, I., Panknin, U., Gorb, S. N., Gutowska, M. A. (2011). Food supply and seawater pCO_2 impact calcification and internal shell dissolution in the blue mussel *Mytilus edulis*. *PLoS ONE* 6(9): e24223. doi:10.1371/journal.pone.0024223
- Melzner, F., Thomsen, J., Koeve, W., Oeschies, A., Gutowska, M. A., Bange, H. W., Hansen, H. P., Körtzinger, A. (2013). Future ocean acidification will be amplified by hypoxia in coastal habitats. *Marine Biology* 160, 1875-1888.
- Michaelidis, B., Ouzounis, C., Paleras, A., Pörtner, H.-O. (2005). Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series* 293, 109-118.
- Michaelidis, B., Spring, A., Pörtner, H.-O. (2007). Effects of long-term acclimation to environmental hypercapnia on extracellular acid-base status and metabolic capacity in Mediterranean fish *Sparus aurata*. *Marine Biology* 150, 1417-1429.
- Mijalski, T., Harder, A., Halder, T., Kersten, M., Horsch, M., Strom, T. M., Liebscher, H. V., Lottspeich, F., Hrabe de Angelis, M., Beckers, J. (2004). Identification of coexpressed gene clusters in a comparative analysis of transcriptome and proteome in mouse tissues. *PNAS* 102(24), 8621-8626.
- Miles, H., Widdicombe, S., Spicer, J. I., Hall-Spencer, J. (2007). Effects of anthropogenic seawater acidification on acid-base balance in the sea urchin *Psammechinus miliaris*. *Marine Pollution Bulletin* 54, 89-96.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzert, M., Roch, P. (2000). Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *The Journal of Biological Chemistry* 275(17), 12954-12962.

Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T., Matsushiro, A. (1996). A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. PNAS 93(18), 9657-9660.

Miyamoto, H., Miyoshi, F., Kohno, J. (2005). The carbonic anhydrase domain protein nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusc *Pinctada fucata*. Zoological Science 22, 331-315.

Mount, A. S., Wheeler, A. P., Paradkar, R. P., Snider, D. (2004). Hemocyte-mediated shell mineralization in the Eastern Oyster. Science 304, 297-300.

Moya, A., Huisman, L., Ball, E. E., Hayward, D. C., Grasso, L. C., Chua, C. M., Woo, H. N., Gattuso, J.-P., Forêt, S., Miller, D. J. (2012). Whole transcriptome analysis of the coral *Acropora millepora* reveals complex responses to CO₂-driven acidification during initiation of calcification. Molecular Ecology 21(10), 2440-2454.

Munday, P. L., Dixon, D. L., Donelson, J. M., Jones, G. P., Pratchett, M. S., Devitsina, G. V., Døving, K. B. (2009). Ocean acidification impairs olfactory discrimination and homing ability of a marine fish. PNAS 106(6), 1848-1852.

Nagai, K., Yano, M., Morimoto, K., Miyamoto, H. (2007). Tyrosinase localization in mollusc shells. Comparative Biochemistry and Physiology B 146, 207-214.

Nakicenovic, N., Alcamo, J., Davis, G., de Vries, B., Fenhann, J., Gaffin, K. G., Grubler, A., et al. (2000). Special Report on Emissions Scenarios: A Special Report of Working Group III of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge, U.K.

Nakahara, H. (1991). Nacre formation in bivalve and gastropod molluscs. In: Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems, pp. 343-350, Springer Verlag.

Nakahara, H., Bevelander, G. (1971). The formation and growth of the prismatic layer of *Pinctada radiata*. Calcified Tissue Research 7(1), 31-45.

Nalivaeva, N. N., Turner, A. J. (2001). Post-translational modifications of proteins: acetylcholinesterase as a model system. Proteomics 1, 735-747.

Nassif, N., Pinna, N., Gehrke, N., Antonietti, M., Jäger, C., Cölfen, H. (2005). Amorphous layer around aragonite platelets in nacre. PNAS 102(36), 12653-12655.

Navarro, J. M., Gonzalez, C. M. (1998). Physiological responses of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* to decreasing salinities. Aquaculture 167, 315-327.

Navarro, J. M., Torres, R., Acuna, K., Duarte, C., Manriquez, P. H., Lardies, M., Lagos, N. A., Vargas, C., Aguilera, V. (2013). Impact of medium-term exposure to elevated pCO₂ levels on the physiological energetics of the mussel *Mytilus chilensis*. Chemosphere 90(3), 1242-1248.

Newell, R. I. E. (1989). Species profiles: Life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (North and Mid-Atlantic): Blue mussel. Biological Report 82 (11.102).

Nissom, P. M., Sanny, A., Kok, Y. J., Hiang, Y. T., Chuah, S. H., Shing, T. K., Lee, Y. Y., Wong, K. T. K., Hu, W., Sim, M. Y. G., Philp, R. (2006). Transcriptome and proteome profiling to understanding the biology of high productivity CHO cells. Molecular Biotechnology 34(2), 125-140.

- Norling, P., Kautsky, N. (2007). Structural and functional effects of *Mytilus edulis* on diversity of associated species and ecosystem functioning. Marine Ecology Progress Series 351, 163-175.
- Nudelman, F., Gotliv, B. A., Addadi, L., Weiner, S. (2006). Mollusk shell formation: Mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. Journal of Structural Biology 153, 176-187.
- O'Donnell, M. J., Todgham, A. E., Sewell, M. A., Hammond, L. M., Fanguie, N. A., Zippay, M. L., Hofmann, G. E. (2010). Ocean acidification alters skeletogenesis and gene expression in larval sea urchins. Marine Ecology Progress Series 398, 157-171.
- Olivares, C., Solano, F. (2009). New insights into the active structure and catalytic structure of tyrosinase and its related proteins. Pigment Cell and Melanoma Research 22(6), 750-760.
- Owen, G. (1966). Digestion. In: Physiology of Mollusca II. (K. M. Wilbur, C. M. Jonge, eds.), pp.53-96, Academic Press, New York.
- Owen, G., Trueman, E. R., Yonge, C. M. (1953). The ligament in the Lamellibranchia. Nature 171, 73-75.
- Padilla-Gamino, J. L., Kelly, M. W., Evans, T. G., Hofmann, G. E. (2013). Temperature and CO₂ additively regulate physiology, morphology and genomic responses of larval sea urchins, *Strongylocentrotus purpuratus*. Proceedings of the Royal Society B 280: 20130155.
- Pane, E. F., Barry, J. P. (2007). Extracellular acid-base regulation during short-term hypercapnia is effective in a shallow-water crab, but ineffective in a deep-sea crab. Marine Ecology Progress Series 334, 1-9.
- Petit, H., Davis, W. L., Jones, R. G., Hagler, H. K. (1980). Morphological studies on the calcification process in the fresh-water mussel *Amblema*. Tissue and Cell 12(1), 13-28.
- Petit, J. R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N. I., Barnola, J.-M., Basile, I., Bender, M., Chappellaz, J., Davis, M., Delaygue, G., Delmotte, M., Kotlyakov, V. M., Legrand, M., Lipenkov, V. Y., Lorius, C., Pépin, L., Ritz, C., Saltzman, E., Stievgard, M. (1999). Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. Nature 399, 429-436.
- Philipp, E. E. R., Kraemer, L., Melzner, F., Pouska, A. J., Thieme, S., Findeisen, U., Schreiber, S., Rosenstiel, P. (2012). Massively parallel RNA sequencing identifies a complex immune gene repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. PLoS ONE 7(3): e33091. doi:10.1371/journal.pone.0033091.
- Place, S. P., Menge, B. A., Hofmann, G. E. (2012). Transcriptome profiles link environmental variation and physiological response of *Mytilus californianus* between Pacific tides. Functional Ecology 26, 144-155.
- Pörtner, H.-O. (2008). Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. Marine Ecology Progress Series 373, 203-217.
- Pörtner, H.-O., Langenbuch, M., Michaelidis, B. (2005). Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia and increases in CO₂ on marine animals: from earth history to global change. Journal of Geophysical Research-Oceans 110, CS09S10, doi:10.1029/2004JC002561.
- Pörtner, H.-O., Reipschläger, A., Heisler, N. (1998). Acid-base regulation, metabolism and energetics in *Sipunculus nudus* as a function of ambient carbon dioxide level. The Journal of Experimental Biology 201, 43-55.

- Politi, Y., Arad, T., Klein, E., Weiner, S., Addadi, L. (2004). Sea urchin spine calcite forms via a transient amorphous calcium carbonate phase. *Science* 306, 1161-1164.
- Price, N. N., Hamilton, S. L., Tootell, J. S., Smith, J. E. (2011). Species-specific consequences of ocean acidification for the calcareous tropical green algae *Halimeda*. *Marine Ecology Progress Series* 440, 67-78.
- Qui, J.-W., Tremblay, R., Bourget, E. (2002). Ontogenetic changes in hyposaline tolerance in the mussel *Mytilus edulis* and *M. trossulus*: implications for distribution. *Marine Ecology Progress Series* 228, 143-152.
- Range, P., Chicharo, M. A., Ben-Hamadou, R., Pilo, D., Fernandez-Reiriz, M. J., Labarta, U., Marin, M. G., Bressan, M., Matozzo, V., Chinellato, A., Munari, M., El Menif, N. T., Dellali, M., Chicharo, L. (2013). Impacts of CO₂-induced seawater acidification on coastal Mediterranean bivalves and interactions with other climatic stressors. *Regional Environmental Change*, doi: 10.1007/s10113-013-0478-7.
- Range, P., Piló, D., Hamadou-Ben, R., Chicharo, M. A., Matias, D., Joaquim, S., Oliveira, A. P., Chicharo, L. (2012). Seawater acidification by CO₂ in coastal lagoon environment: Effects on life history traits of juvenile mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 424-425, 89-98.
- Reipschläger, A., Pörtner, H.-O. (1996). Metabolic depression during environmental stress: the role of extracellular versus intracellular pH in *Sipunculus nudus*. *Journal of Environmental Biology* 199, 1801-1807.
- Remane, A. (1971). Ecology of brackish waters, In Remane, A. & Schlieper, C. (eds) *Biology of Brackish Water*, 2nd edition, Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, pp.1-210.
- Ridgwell, A., Zeebe, R. E. (2005). The role of the global carbonate cycle in the regulation and evolution of the Earth system. *Earth and Planetary Science Letters* 234, 299-315.
- Riebesell, U., Zondervan, I., Rost, B., Tortell, P. D., Zeebe, R. E., Morel, F. M. M. (2000). Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO₂. *Nature* 407, 364-367.
- Ries, J. B., Cohen, A. L., McCorkle, D. C. (2009). Marine calcifiers exhibit mixed response to CO₂-induced ocean acidification. *Geology* 37, 1131-1134.
- Ries, J. B., Cohen, A. L., McCorkle, D. C. (2010). A nonlinear calcification response to CO₂-induced ocean acidification by the coral *Oculina arbuscula*. *Coral Reefs* 29, 661-674.
- Riginos, C., Cunningham, C. W. (2005). Local adaptation and species segregation in two mussel (*Mytilus edulis* x *Mytilus trossulus*) hybrid zone. *Molecular Ecology* 14, 381-400.
- Riisgård, H. U., Randløv, A. (1981). Energy budgets, growth and filtration rates in *Mytilus edulis* at different algal concentrations. *Marine Biology* 61, 227-234.
- Rodhe, H. (1990). A comparison of the contribution of various gases to the greenhouse effect. *Science* 248, 1217-1219.
- Rodolfo-Metalpa, R., Houlbrèque, F., Tambutté, É., Boisson, F., Baggini, C., Patti, F. P., Jeffree, R., Fine, M., Foggo, A., Gattuso, J.-P., Hall-Spencer, J. M. (2011). Coral and mollusc resistance to ocean acidification adversely affected by warming. *Nature Climate Change* 1, 308-312.

- Ross, P. M., Parker, L., O'Connor, W. A., Bailey, E. A. (2011). The impact of ocean acidification on reproduction, early development and settlement of marine organisms. *Water* 3, 1005-1030.
- Rousseau, M., Bedouet, L., Lati, E., Gasser, P., Le Ny, K., Lopez, E. (2006). Restoration of stratum corneum with nacre lipids. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 145, 1-9.
- Roy, R. N., Roy, L. N., Vogel, K. M., Porter-Moore, C., Pearson, T., Good, C. E., Millero, F. J., Campbell, D. M. (1993). The dissociation constants of carbonic acid in seawater at salinities 5 to 45 and temperatures 0 to 45°C. *Marine Chemistry* 44, 249-267.
- Sabine, C. L., Feely, R. A., Gruber, N., Key, R. M., Lee, K., Bullister, J. L., Wanninkhof, R., Wong, C. S., Wallace, D. W. R., Tilbrook, B., Millero, F. J., Peng, T.-H., Kozyr, A., Ono, T., Rios, A. F. (2004). The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science* 305, 367-371.
- Salonen, K., Sarvala, J., Hakala, I., Viljanen, M.-L. (1976). The relation of energy and organic carbon in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography* 21(5), 724-730.
- Sanford, E., Kelly, M. W. (2011). Local adaptation in marine invertebrates. *Annual Review of Marine Science* 3, 509-535.
- Sarashina, I., Endo, K. (2001). The complete primary structure of molluscan shell protein 1 (MSP-1), an acidic glycoprotein in the shell matrix of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Marine Biotechnology* 3(4), 362-369.
- Schneider, K., Erez, J. (2006). The effect of carbonate chemistry on calcification and photosynthesis in the hermatypic coral *Acropora eurystoma*. *Limnology and Oceanography* 51(3), 1284-1293.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* 68, 850-858.
- Silvestre, F., Gillardin, V., Dorts, J. (2012). Proteomics to assess the role of phenotypic plasticity in aquatic organisms exposed to pollution and global warming. *Integrative and Comparative Biology* 52(5), 681-694.
- Sobral, P., Widdows, J. (1997). Effects of elevated temperatures on the scope for growth and resistance to air exposure of the clam *Ruditapes decussatus* (L.), from Southern Portugal. *Scientia Marina* 61(1), 163-171.
- Soot-Ryen, T. (1955). A report on the family Mytilidae (Pelecypoda) in Allan Hancock Pacific expeditions, Vol. 20(1), The university of Southern California publications, Los Angeles, pp. 1-175.
- Spicer, J. I., Widdicombe, S., Needham, H. R., Berge, J. A. (2011). Impact of CO₂-acidified seawater on the extracellular acid-base balance of the northern sea urchin *Strongylocentrotus dröebachiensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 407, 19-25.
- Stuckas, H., Stoff, K., Quesada, H., Tiedemann, R. (2009). Evolutionary implications of discordant clines across the Baltic *Mytilus* hybrid zone (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*). *Heredity* 103, 146-156.
- Stumpp, M., Hu, M., Casties, I., Saborowski, R., Bleich, M., Melzner, F., Dupont, S. (2013). Digestion in sea urchin larvae impaired under ocean acidification. *Nature Climate Change* 3, 1044-1049.

Stumpp, M., Trübenbach, K., Brennecke, D., Hu, M. Y., Melzner, F. (2012). Resource allocation and extracellular acid-base status in the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* in response to CO₂ induced seawater acidification. *Aquatic Toxicology* 110-111, 194-207.

Stumpp, M., Dupont, S., Thorndyke, M. C., Melzner, F. (2011b). CO₂ induced seawater acidification impacts sea urchin larval development II: gene expression patterns in pluteus larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 160(3), 320-330.

Stumpp, M., Wren, J., Melzner, F., Thorndyke, M. C., Dupont, S. (2011a). CO₂ induced seawater acidification impacts sea urchin larval development I: elevated metabolic rates decrease scope for growth and induce developmental delay. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 160(3), 331-340.

Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M., Nakashima, K., Takahashi, T. (1997). Structure of mollusc shell framework proteins. *Nature* 387, 563-564.

Suzuki, M., Saruwatari, K., Kogure, T., Yamamoto, Y., Nishimura, T., Kato, T., Nagasawa, H. (2009). An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation. *Science* 325, 1388-1390.

Talmage, S. C., Gobler, C. J. (2010). Effects of past, present, and future ocean carbon dioxide concentrations on the growth and survival of larval shellfish. *PNAS* 107(40), 17246-17251.

Talmage, S. C., Gobler, C. J. (2011). Effects of elevated temperature and carbon dioxide on the growth and survival of larvae and juveniles of three species of Northwest atlantic bivalves. *PLoS ONE* 6(10): e26941. doi:10.1371/journal.pone.0026941.

Taylor, J. D., Kennedy, W. J. (1969). The influence of the periostracum on the shell structure of bivalve molluscs. *Calcified Tissue Research* 3(3), 274-283.

Thomas, H., Bozec, Y., Elkalay, K., de Baar, H. J. W., Borges, A. V., Schiettecatte, L.-S. (2005). Controls of the surface water partial pressure of CO₂ in the North Sea. *Biogeosciences* 2, 323-334.

Thomas, M. A., Klaper, R. (2004). Genomics for the ecological toolbox. *TRENDS in Ecology and Evolution* 19(8), 439-445.

Thomsen, J., Casties, I., Pansche, C., Körtzinger, A., Melzner, F. (2013). Food availability outweighs ocean acidification effects in juvenile *Mytilus edulis*: laboratory and field experiments. *Global Change Biology* 19(4), 1017-1027.

Thomsen, J., Gutowska, M. A., Saphörster, J., Heinemann, A., Trübenbach, K., Fietzke, J., Hiebenthal, C., Eisenhauer, A., Körtzinger, A., Wahl, M., Melzner, F. (2010). Calcifying invertebrates succeed in naturally CO₂-rich coastal habitat but are threatened by high levels of future acidification. *Biogeosciences* 7, 3879-3891.

Thomsen, J., Melzner, F. (2010). Moderate seawater acidification does not elicit long-term metabolic depression in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 157, 2667-2676.

Todgham, A. E., Hofmann, G. E. (2009). Transcriptomic response of sea urchin larvae *Strongylocentrotus purpuratus* to CO₂-driven seawater acidification. *The Journal of Experimental Biology* 212, 2579-2594.

Tomanek, L., Zuzow, M. J., Hitt, L., Serafini, L., Valenzuela, J. J. (2012). Proteomics of hyposaline stress in blue mussel congeners (genus *Mytilus*): implications for biogeographic

range limits in response to climate change. *The Journal of Experimental Biology* 215, 3905-3916.

Tomanek, L., Zuzow, M. J., Ivanina, A. V., Beniash, E., Sokolova, I. M. (2011). Proteomic response to elevated PCO_2 level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. *The Journal of Experimental Biology* 214, 1836-1844.

Tomanek, L., Zuzow, M. J. (2010). The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance limits and metabolic costs of thermal stress. *The Journal of Experimental Biology* 213, 3559-3574.

Tunnicliffe, V., Davies, K. T. A., Butterfield, D. A., Embley, R. W., Rose, J. M., Chadwick, W. W. Jr. (2009). Survival of mussels in extremely acidic waters on a submarine volcano. *Nature Geosciences* 12, 344-348.

Waldbusser, G. G., Voigt, E. P., Bergschneider, H., Green, M. A., Newell, R. I. E. (2011). Biocalcification in the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) in relation to long-term trends in Chesapeake Bay pH. *Estuaries and Coasts* 34, 221-231.

Waite, J. H. (1983). Quinone-tanned scleroproteins. In: Saleuddin, A. S. M., Wilbur, K. M. (Eds.), *The Mollusca, Physiology*, Vol. 4, Academic Press, New York, pp. 467-504.

Waite, J. H., Andersen, S. O. (1978). 3,4-dihydroxyphenylalanine in an insoluble shell protein of *Mytilus edulis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 541, 107-114.

Waite, J. H., Andersen, S. O. (1980). 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) and sclerotization of periostracum in *Mytilus edulis* L. *Biological Bulletin* 158(1), 164-173.

Waite, J. H., Saleuddin, A. S. M., Andersen, S. O. (1979). Periostracin - A soluble precursor of sclerotized periostracum in *Mytilus edulis* L. *Journal of Comparative Physiology* 130, 301-307.

Waite, J. H., Wilbur, K. M. (1976). Phenoloxidase in the periostracum of the marine bivalve *Modiolus demissus* Dillwyn. *Journal of Experimental Zoology* 195, 359-368.

Walter, M. R., Buick, R., Dunlop, J. S. R. (1980). Stromatolites 3,400-3,500 myr old from the North pole area, Western Australia. *Nature* 284, 443-445.

Walther, K., Anger, K., Pörtner, H.-O. (2010). Effects of ocean acidification and warming on the larval development of the spider crab *Hya araneus* from different latitudes (54° vs. 79°N). *Marine Ecology Progress Series* 417, 159-170.

Wang, X., Li, L., Zhu, Y., Du, Y., Song, X., Chen, Y., Huang, R., Que, H., Fang, X., Zhang, G. (2013). Oyster shell proteins originate from multiple organs and their probable transport pathway to the shell formation front. *PLoS One* 8(6): e66522. doi: 10.1371/journal.pone.0066522.

Watson, S.-A., Southgate, P. C., Tyler, P. A., Peck, L. S. (2009). Early larval development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* under near-future predictions of CO_2 -driven ocean acidification. *Journal of Shellfish Research* 28(3), 431-437.

Weiner, S. (1979). Aspartic acid-rich proteins: major components of the soluble matrix of mollusk shells. *Calcified Tissue International* 29(2), 163-167.

Weiner, S., Addadi, L. (2011). Crystallization pathways in biomineralization. *Annual Review of Materials Research* 41, 21-40.

- Weiner, S., Hood, L. (1975). Soluble protein of organic matrix of mollusk shells: a potential template for shell formation. *Science* 190(4218), 987-988.
- Weiner, S., Traub, W. (1980). X-ray diffraction study of the insoluble organic matrix of mollusk shells. *FEBS letters* 111(2), 311-316.
- Weiss, I. M. (2010). Jewels in the pearl. *Chembiochem* 11(3), 297-300.
- Weiss, I. M., Tuross, N., Addadi, L., Weiner, S. (2002). Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. *Journal of Experimental Zoology* 293, 478-491.
- Welladsen, H. M., Southgate, P. C., Heimann, K. (2010). The effects of exposure to near-future levels of ocean acidification on shell characteristics of *Pinctada fucata* (Bivalvia: Pteriidae). *Molluscan Research* 30(3), 125-130.
- Westerbom, M., Kilpi, M., Mustonen, O. (2002). Blue mussels, *Mytilus edulis*, at the edge of the range: population structure, growth and biomass along a salinity gradient in the north-eastern Baltic Sea. *Marine Biology* 140, 991-999.
- Widdows, J. (1973). The effects of temperature on the metabolism and activity of *Mytilus edulis*. *Netherlands Journal of Sea Research* 7, 387-398.
- Wigley, T. M. L., Richels, R., Edmonds, J. A. (1996). Economic and environmental choices in the stabilization of atmospheric CO₂ concentrations. *Nature* 378, 240-243.
- Wilbur, K. M., and Saleuddin, A. S. M. (1983). Shell formation. In: Saleuddin, A. S. M. and Wilbur, K. M. (eds) *The Mollusca*, vol. 4. Academic Press, New York, 235-287.
- Williams, R. J. (1970). Freezing tolerance in *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 35(1), 145-161.
- Windisch, H. S., Kathöver, R., Pörtner, H.-O., Frickenhaus, S., Lucassen, M. (2011). Thermal acclimation in Antarctic fish: transcriptomic profiling of metabolic pathways. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 301, R1453-1466.
- Yano, M., Nagai, K., Morimoto, K., Miyamoto, H. (2006). Shematrin: a family of glycine-rich structural proteins in the shell of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 144, 254-262.
- Yonge, C. M. (1925). The hydrogen ion concentration in the gut of certain lamellibranchs and gastropods. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 13, 938-952.
- Yonge, C. M. (1948). Formation of siphons in Lamellibranchia. *Nature* 161, 198-199.
- Yonge, C. M. (1953). Form and habit in *Pinna carnea* Gmelin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 237, 335-374.
- Zeebe, R. E., Wolf-Gladrow, D. A. (2001). CO₂ in seawater: equilibrium, kinetics, isotopes. Elsevier Oceanography Series, Amsterdam.
- Zhang, C., Xie, L., Huang, J, Chen, L., Zhang, R. (2006). A novel tyrosinase involved in perisotracum formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342(2), 632-639.

Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P. W., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Loso, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P. M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C. E., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490(7418), 49-54.

Zhou, Z., Ni, D., Wang, M., Wang, L., Wang, L., Shi, X., Yue, F., Liu, R., Song, L. (2012). The phenoloxidase activity and antibacterial function of a tyrosinase from scallop *Chlamys farreri*. *Fish and Shellfish Immunology* 33(2), 375-381.

Zittier, Z. M. C., Bock, C., Lannig, G., Pörtner, H.-O. (eingereicht bei *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*). Impact of ocean acidification on thermal tolerance and acid-base regulation of *Mytilus edulis* (L.) from the North Sea.

7 Anhang

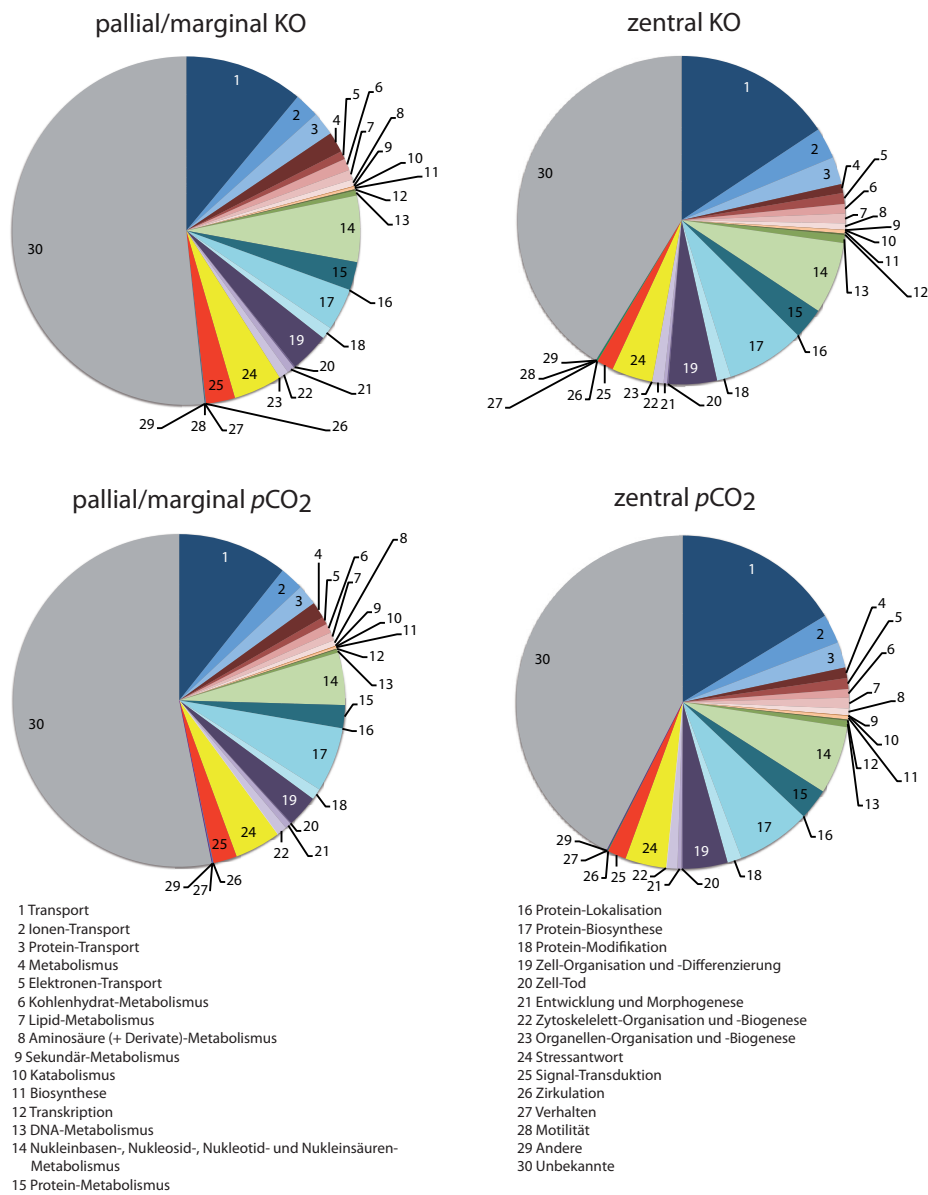


Abb. 7.1: Einteilung der Reads pro Million in die Kategorie „Biologischer Prozess“. Als Gewebe dienten zentrale und palliale/marginale Mäntel von Kontroll-Tieren (KO, 500 μatm) und von Muscheln, die bei erhöhtem $p\text{CO}_2$ (3700 μatm) inkubiert wurden.

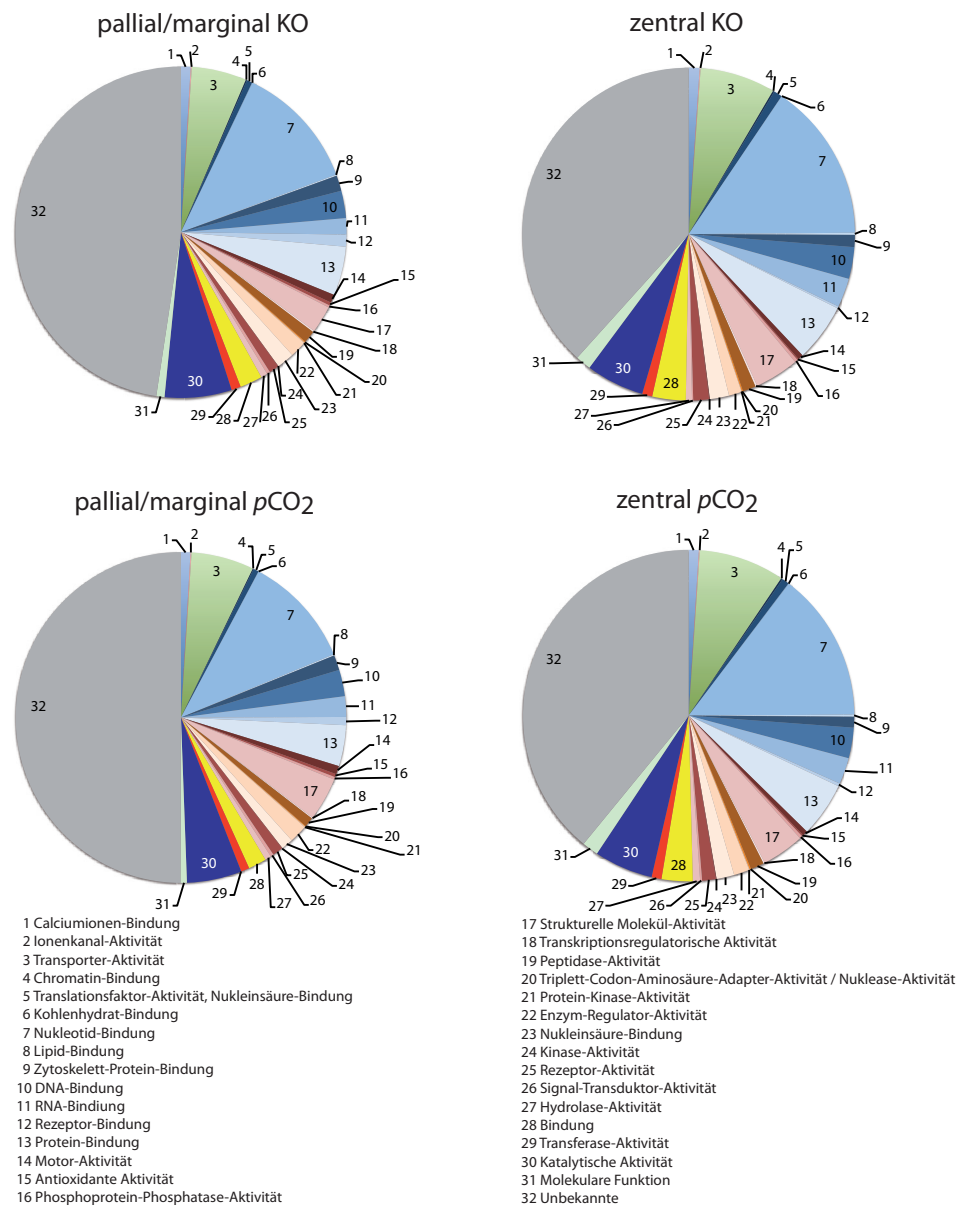


Abb. 7.2: Einteilung der Reads pro Million in die Kategorie „Molekulare Funktion“. Als Gewebe dienten zentrale und palliale/marginale Mäntel von Kontroll-Tieren (KO, 500 μatm) und von Muscheln, die bei erhöhtem $p\text{CO}_2$ (3700 μatm) inkubiert wurden.

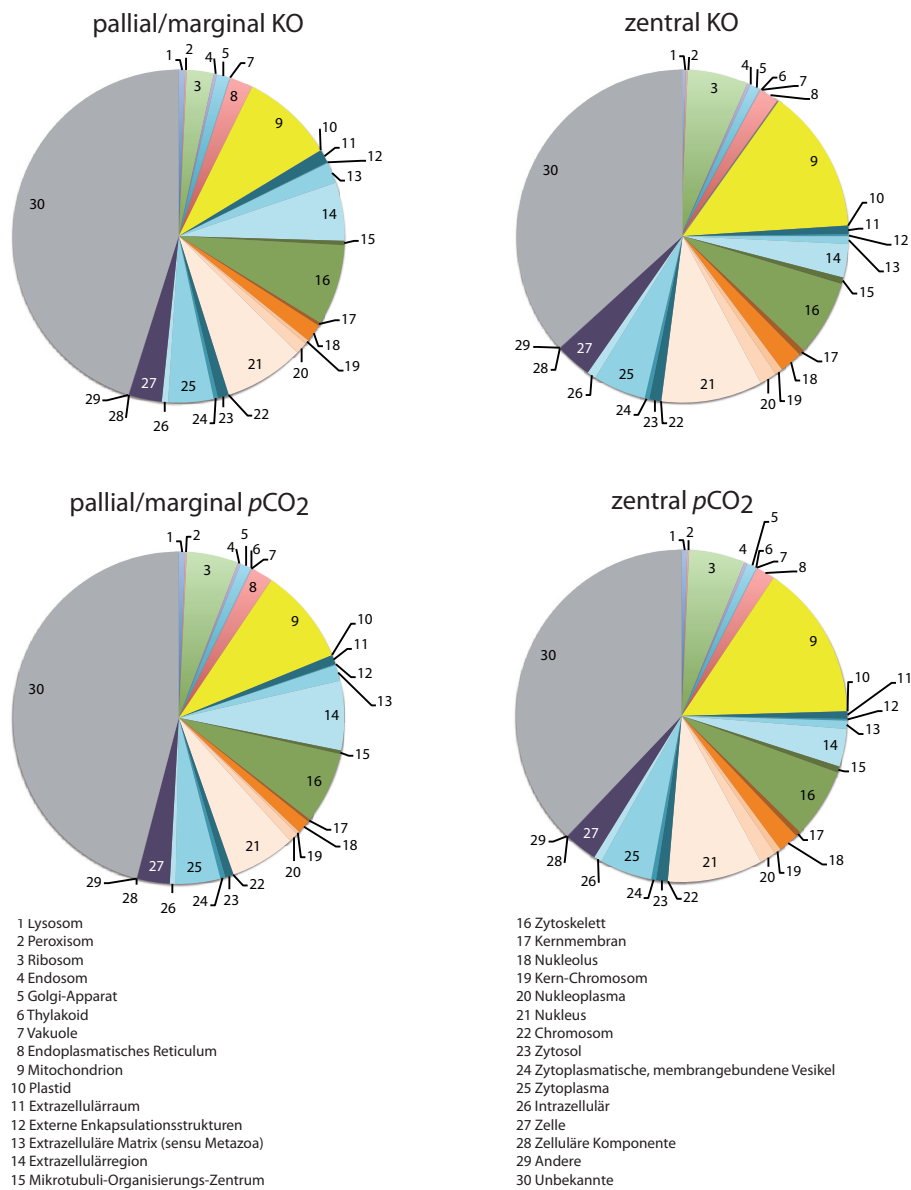


Abb. 7.3: Einteilung der Reads pro Million in die Kategorie „Zelluläre Komponente“. Als Gewebe dienten zentrale und palliale/marginale Mäntel von Kontroll-Tieren (KO, 500 μatm) und von Muscheln, die bei erhöhtem $p\text{CO}_2$ (3700 μatm) inkubiert wurden.

8 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei

Prof. Dr. Hans-Otto Pörtner

für die Möglichkeit, dass ich in seiner Sektion meine Doktorarbeit durchführen konnte, und besonders für die Bemühungen, die mir einen erneuten Forschungsaufenthalt in Kalifornien ermöglichten.

Dr. Frank Melzner

für die Betreuung aus Kiel samt den fruchtbaren Diskussionen, die den Fortgang meiner Arbeit stark angetrieben haben und für die ständig motivierenden Ermutigungen und Ratschläge.

Dr. Magnus Lucassen

für die direkte Betreuung im S1-Labor, die zahlreichen Diskussionen und regelmäßigen Gespräche, die meinen fokussierten Molekularbiologen-Blick geweitet haben.

Prof. Dr. Wilhelm Hagen

für seine Bereitschaft als Prüfer zu fungieren.

Dr. Jörn Thomsen

für das ständige Bemühen, mir die physiologische Welt etwas näher zu bringen, die hilfreichen Diskussionen und für sein enormes Paper-Autoren-Inhalt-Jahr-Wissen.

Prof. Dr. Stephan Frickenhaus

für seinen Einsatz bei der Erstellung der Korrelationsnetzwerke.

Skadi Lange

für die Mitarbeit im Rekalzifizierungsprojekt und natürlich für die Eiscreme.

Dr. Eva Philipp und Lars Krämer

für die Assemblierung der Reads und die bioinformatischen Hilfestellungen bei der Arbeit mit den Sequenzierdaten.

Ulli Panknin

für ihre stets aufmunternde Art und die Überzeugung, dass alles noch viel schlimmer kommen kann, ihre Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente, und dafür, dass bei ihr während meiner Aufenthalte in Kiel immer ein Bett frei war.

Dr. Heidrun Windisch

für die Unterstützung bei der Gestaltung des Deckblatts dieser Arbeit.

der Sektion "Integrative Ökophysiologie" und der Arbeitsgruppe "Ökophysiologie"

für ein angenehmes Arbeitsklima und die vielen netten Gespräche.

dem "Environmental Proteomics Laboratory", dabei besonders Prof. Dr. Lars Tomanek, Marcus Zuzow und Hayley Chilton

für die Betreuung, die Hilfestellungen beim Erlernen von neuen Methoden und für die Unterstützung meiner Laborarbeit an der Cal Poly in San Luis Obispo.

dem Stammtisch Bremerhaven

für regelmäßige Ablenkungen und Lach-Kuren.

meiner Familie und besonders Danilo

für die immerwährende Unterstützung und den ständigen Versuch, schwere Zeiten zum Guten zu wenden, sowie die regelmäßigen "Erholungsphasen", die mich von Zeit zu Zeit von der Arbeit ablenken konnten.

9 Erklärung

Anne Hüning
Sonnenstr. 5
27568 Bremerhaven

Bremerhaven, den 15.01.2014

Erklärung gemäß § 6(5) der Promotionsordnung der Universität Bremen für die mathematischen, natur- und ingenieurwissenschaftlichen Fachbereiche

(vom 14. März 2007)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit mit dem Titel:

"Kompensationsvermögen von *Mytilus edulis* gegenüber mechanischem Stress und erhöhtem $p\text{CO}_2$ – kombinierte transkriptomische, proteomische und physiologische Analysen"

1. ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe,
2. keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und
3. die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Anne Hüning